

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude LIORET

CHARGÉ DE RECHERCHES AU C. N. R. S.

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME DE DEUX
TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS *IN VITRO*.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 6 juin 1958, devant la Commission d'examen.

MM. PLANTEFOL.... *Président.*
GAUTHERET ... } *Examineurs.*
LIEDERER }
MOYSE }

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

—
1960

Série A. N°
N° d'ordre :

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Claude LIORET

CHARGÉ DE RECHERCHES AU C. N. R. S.

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME DE DEUX
TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS *IN VITRO*.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 6 juin 1958, devant la Commission d'examen.

MM. PLANTEFOL....	<i>Président.</i>
GAUTHERET ...	} <i>Examineurs.</i>
LEDERER	
MOYSE	

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1960

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen. M. J. PÉRÈS.

Professeurs

G. JULIA	T	Anal. sup. et alg. sup.	NORMANT	T	Chimie organique.
FOCH	T	Mécan. phys. et expér.	BENARD	T	Chimie minérale.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
PRENANT	T	Anat. et hist. comparées.	DUGUÉ	T	Statist. mathématiques.
PÉRÈS	T	Mécan. des fluides et appl.	GÉLOSO	T	Chimie (S.P.C.N.).
M. CURIE	T	Physique (S.P.C.N.).	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
BARRABÉ	T	Géol. struct. et appl.	ULRICH	T	Physiologie végétale.
J. BOURCART	T	Géogr. phys. et géol. dyn.	MARÉCHAL	T	Opt. théorie et appl.
PLANTEFOL	T	Botanique.	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
GRASSÉ	T	Evol. des êtres organisés.	CHADEFAUD	T	Botanique.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	DESTRIAU	T	Physique (M.P.C.).
BOULIGAND	T	Appl. de l'anal. à la géom.	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiologie générale.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	SALEM	T	Mathématiques génér.
WYART	T	Minéralogie.	LELONG	T	Mathématiques génér.
TEISSIER	T	Zoologie.	DEVILLERS	T	Anat. et histol. compar.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
P. AUGER	T	Phys. quantique et Relat.	FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
MONNIER	T	Physiologie générale.	GLANGEAUD	T	Géogr. phys. et géol. dyn.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	GODEMENT	T	Mathémat. (M.P.C.).
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	PISOT	T	Calc. des probabilités.
H. CARTAN	T	Mathémat. (E.N.S.).	E. ROCH	T	Géologie.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	SCHATZMANN	T	Astrophysique.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	TERMIER	T	Paléontol. stratigraph.
COULOMB	T	Physique du Globe.	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
Mlle COUSIN	T	Biol. animale (S.P.C.N.).	LENNUIER	T	Physique (M.P.C.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	RIZET	T	Génétique.
P. DRACH	T	Zoologie.	ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).	M ^{me} TONNELAT	T	Théories physiques.
EPHRUSSI	T	Génétique.	DIXMIER	T	Mathémat. h (M.P.C.).
WURMSER	T	Biol. physico-chimique.	SOUCHAY	T	Chimie générale.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.).	AIGRAIN	T	Electrotechnique.
GAUTHIERET	T	Biol. végétale (P.C.B.).	BRUSSET	T	Chimie minérale.
LUCAS	T	Recherches physiques.	M. LÉVY	T	Physique théorique.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
ARNULF	T	Optique appliquée.	Mme HUREL-Py	T	Biologie vég. (P.C.B.).
M. MORAND	T	Enseign. de Physique.	PIAUX	T	Chimie (P.C.B.).
SOLEILLET	T	Physique.	BRUN	T	Méc. expér. des fluides.
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.	LEDERER	T	Chimie des subst. org. nat.
DANJON	T	Astronomie.	Mme DUBREIL	T	Mathématiques.
LAPORTE	T	Phys. gén. et radio-act.	Mme LELONG	T	Mathém. (E.N.S.).
JANET	T	Méc. anal. et Méc. céleste.	BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
PETIT	T	Biologie maritime.	COTTE	T	Physique (M.P.C.).
QUENEY	T	Mét. et dyn. atmosphér.	DUBOIS J. E. T	T	Chimie (S.P.C.N.).
GALLIEN	T	Embryologie.	LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
EICHORN	T	Biologie vég. (S.P.C.N.).	LE ROLLAND	T	Mécan. des fluides.
DE CUGNAC	T	Biologie vég. (S.P.C.N.).	A. MICHEL	T	Chimie (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.	OLMER	T	Energétique générale.
THELLIER	T	Physique du Globe.	ROUAULT	T	Physique générale.
L'HÉRITIER	T	Génétique.	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
GRIVET	T	Radioélectricité.	BARCHIEWITZ	T	Chimie physique.
PONCIN	T	Mécanique générale.	BROSSEL	T	Physique atomique.
DUBREIL	T	Arith. et théor. des nombr.	BUSER	T	Biol. animale (P.C.B.).
QUELET	T	Chimie organique.	CAMUS	T	Biol. végétale (P.C.B.).
CAGNIARD	T	Géophys. appliquée.	CASTAING	T	Physique générale.
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.	CURIEN	T	Minéral. et cristallogr.
CUVILLIER	T	Géol. struct. et appliquée.	MOYSE	T	Physiologie végétale.
JUNG	T	Pétrographie.	NOIROT	T	Evol. des êtres organisés.
TRILLAT	T	Microsc. et diff. électron.	PANNETIER	T	Chimie (S.P.C.N.).
WIEMANN	T	Chim. organ. structurale.	POSSIMPS	T	Biologie anim. (P.C.B.).
JACQUINOT	T	Spectr. et phys. céleste.	PULLMANN	T	Chimie théorique.
VASSY	T	Phys. de l'atmosphère.	TEILLAC	T	Phys. nucléaire et radioac.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.	TONNELAT	T	Biol. physico-chimique.
M. PRUVOST	T	Géologie.	VILLE	T	Econométrie.
AMIEL	T	Chimie générale (P.C.B.).	WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).
HOCART	T	Minéralogie.	DODÉ	T	Chimie.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.).	FREYMAN	T	Physique (S.P.C.N.).
COUTEAUX	T	Biol. anim. (P.C.B.).	GUINCHET	T	Biologie végét. (Orsay).
MAY	T	Biol. anim. (P.C.B.).	ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
CHOCQUET	T	Calc. diff. et intégral.	Mlle JOUEN	T	Chimie (P.C.B.).
FELDMANN	T	Biologie (P.C.B.).	CHEVALLEY	T	Géom. alg. et théor. d. gr.
GUINIER	T	Physique des solides.	ARNOULT	T	Physique (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.	CHAPPELLE	T	Physique (P.C.B.).
FORTET	T	Calc. des probabilités.	DELANGÉ	T	Mathématiq. (Orsay).
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.	DENY	T	Mathématiq. (Orsay).
CHOUARD	T	Physiologie végétale.	GERMAIN	T	Méc. th. des fluides.
MALAVARD	T	Aviation.	G. LUCAS	T	Géologie.
BRELOT	T	Calcul différentiel.			

Secrétaire général C. MONIER



RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME DE DEUX TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS *IN VITRO*

par M. Claude LIORET

INTRODUCTION

La réalisation des cultures de tissus végétaux *in vitro* a apporté aux physiologistes s'intéressant aux plantes supérieures un matériel d'étude qu'ils souhaitaient depuis longtemps, matériel constitué de colonies cellulaires aux différenciations inorganisées et dépourvues de corrélations habituellement présentes dans les organes et les individus entiers. L'utilisation de cette technique a permis un très grand nombre de recherches. Un premier bilan en a été dressé au Colloque sur la Physiologie des Cultures de tissus végétaux, tenu à Briançon en 1954.

Nous connaissons maintenant plusieurs aspects de la physiologie de ces cultures : les besoins nutritifs minéraux et organiques, l'influence sur la croissance des facteurs physiques et de très nombreuses substances chimiques plus ou moins bien définies, l'évolution des substances de croissance propres aux tissus, etc... Cependant, les connaissances relatives au métabolisme général, à l'équilibre existant entre les synthèses et les dégradations, sont très fragmentaires. Ainsi les questions suivantes n'ont-elles que peu de réponses :

— Quelles sont les modifications du métabolisme d'un fragment d'organe mis soudainement au contact d'un milieu nutritif ?

— Quelles sont les modifications du métabolisme intervenant à la suite du repiquage de tissus maintenus en culture indéfinie ?

Les réponses à ces questions seraient cependant d'un intérêt primordial pour toute expérimentation utilisant cette technique de culture. RIKER (cité par GAUTHERET, 1945) fait remarquer que les conditions de la culture *in vitro* sont si différentes de celles réalisées dans l'organisme, qu'elles doivent modifier les propriétés

physiologiques des cellules. Il est donc nécessaire de connaître les modifications du métabolisme qu'entraîne la technique même de la culture *in vitro*.

Il m'a semblé qu'une telle recherche devait, dans une première étape, éviter une étude trop spécialisée, qui n'apporterait que des résultats fragmentaires difficilement interprétables par ignorance des phénomènes connexes. J'ai préféré étudier tout d'abord les grandes lignes de l'activité métabolique des tissus végétaux soumis aux conditions de la culture *in vitro*, en suivant les variations de quelques caractéristiques physiologiques au cours du temps :

— L'accroissement du poids des colonies, qui rend compte de l'ensemble des synthèses.

— Les variations quantitatives des substances azotées, principalement des protéines, qui fournissent des renseignements relatifs à la synthèse du protoplasme.

— Les variations quantitatives des glucides des tissus et du milieu de culture, témoins de l'utilisation matérielle et énergétique des chaînes carbonées alimentaires.

— Les variations des échanges gazeux respiratoires, signes de la vitesse des dégradations.

L'étude de ces variations a porté sur des fragments d'organes sains mis une première fois en présence d'un milieu de culture et sur des colonies de tissus de crown-gall ayant subi de très nombreux repiquages. L'addition au milieu de culture de divers agents chimiques modifie souvent la nature ou la vitesse des phénomènes de croissance. Afin d'étudier l'importance de ces modifications, j'ai fait des cultures en présence soit d'une auxine (1) l'acide α -naphtalène-acétique, soit d'albumen de fruits immatures de *Cocos nucifera* ou lait de Coco, complexe très actif sur la croissance, soit enfin d'une substance inhibitrice, l'hydrazide maléique. Ces substances ont été employées dans le but d'obtenir des modalités de croissance différentes et de suivre les variations du métabolisme qui les caractérisent.

Les résultats obtenus doivent fournir des renseignements sur les quantités de matières synthétisées ou dégradées. Le rendement de la croissance, qui peut en être déduit, est intéressant au point de vue de l'énergétique des réactions de synthèse. La mesure de ce rendement a fait l'objet de nombreux travaux, portant le plus souvent sur des microorganismes, Bactéries et Moisissures.

(1) D'après THIMANN (voir PINCUS et THIMANN, 1948), une auxine est une substance organique qui provoque à très faible concentration l'allongement irréversible d'un rameau (shoot) végétal, sans préjuger de l'origine naturelle ou artificielle de cette substance.

Les seules mesures relatives aux plantes supérieures ont été faites avec des germinations (BARNELL, 1937). Les conditions apportées par la technique des cultures de tissus étant particulièrement favorables, j'ai essayé d'analyser les résultats obtenus à l'aide des raisonnements faits auparavant à propos des microorganismes.

Après l'examen des caractéristiques générales du métabolisme, j'ai choisi, parmi les différentes possibilités de recherche qui se présentaient, l'étude de la protéogenèse. L'ensemencement ou le repiquage sur un milieu neuf sont toujours suivis d'une active synthèse de protéines. L'analyse des acides aminés, par les techniques de chromatographie, offre un moyen commode de suivre les modalités de la protéogenèse. L'analyse a immédiatement mis en évidence la présence, uniquement dans les tissus de crown-gall, d'une substance proche des acides aminés et jusqu'alors inconnue. Ce corps a été retrouvé dans des tissus tumoraux appartenant à des espèces différentes. Etant donné l'intérêt que l'on peut accorder à ces tumeurs, parfois comparables dans leur développement aux tumeurs animales, l'étude de ce corps a été poursuivie. Je l'ai isolé et avec l'aide de M. LEDERER et ses collaborateurs quelques-unes de ses caractéristiques structurales ont été précisées. Enfin des recherches utilisant l'acide glutamique marqué par ^{14}C ont tenté de définir son origine. Si ces recherches n'ont pas donné les renseignements espérés, elles ont permis cependant de dégager ou de confirmer l'existence des relations directes entre les acides aminés et les acides organiques.

Ces recherches ont été commencées au Laboratoire de Biologie végétale de Monsieur le Professeur GAUTHERET ainsi qu'au Laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences à l'Ecole Normale Supérieure à Paris. Elles ont été terminées au Laboratoire de Photosynthèse du Centre National de la Recherche Scientifique à Gif-sur-Yvette.

Elles ont été entreprises à l'instigation de Monsieur GAUTHERET, Membre de l'Institut, Professeur de Biologie végétale à la Sorbonne, auquel je tiens à exprimer toute mon admiration pour sa compétence inégalée dans tous les problèmes relatifs aux cultures des tissus végétaux, ainsi que toute ma gratitude pour l'accueil qu'il m'a réservé et l'intérêt qu'il a porté à mes recherches. Je le remercie également d'avoir bien voulu se charger du rapport de cette thèse.

C'est auprès de Monsieur MOYSE, Professeur à la Sorbonne, Directeur du Laboratoire de Photosynthèse du Centre National de la Recherche scientifique, que j'ai acquis l'emploi des techniques biochimiques nécessaires à toute étude du métabolisme. J'ai trouvé avec lui le guide sûr qui, par ses conseils et ses critiques, m'a enseigné la nécessité de la rigueur expérimentale et de l'effort de réflexion.

xion dans l'interprétation des résultats. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse affection.

Je remercie vivement Monsieur PLANTEFOL, Membre de l'Institut, Professeur de Botanique à la Sorbonne, qui s'est toujours intéressé à mon travail. Il me fut sensible qu'il ait désiré présider mon jury et je lui exprime ma respectueuse gratitude.

Je prie Monsieur LEDERER, Professeur de Chimie biologique à la Sorbonne, d'accepter mes remerciements les plus sincères pour la bienveillance avec laquelle il s'est intéressé aux problèmes de chimie analytique que je lui présentais. Je le remercie également d'avoir bien voulu participer au jury.

Une partie des mises au point techniques sur l'analyse des acides aminés a été faite en collaboration avec Mademoiselle CHAMPIGNY dont l'amitié me fût précieuse tout au long de ce travail.

Que Madame DUHAMET-PARIS qui m'a initié aux techniques de culture de tissus végétaux et Monsieur GORIS, Professeur à l'Ecole de Pharmacie d'Amiens, Pharmacien des Hôpitaux de Paris, qui m'a enseigné les techniques de dosage des glucides, reçoivent mes plus vifs remerciements.

J'ai le plaisir de remercier Mademoiselle GENDRE, Messieurs ASSELINEAU et JOLLES, pour leur contribution à l'étude de la substance inconnue isolée des tissus de crown-gall.

Que tous mes collègues et amis des différents Laboratoires où j'ai travaillé trouvent ici l'expression de ma gratitude pour le climat de cordiale sympathie que j'ai toujours rencontré.

J'exprime enfin ma reconnaissance à Messieurs les Directeurs du Centre National de la Recherche Scientifique, ainsi qu'à Messieurs les membres de la Commission de Biologie Cellulaire pour leur aide matérielle qui m'a permis d'effectuer ce travail.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

La culture des tissus végétaux exige le plus souvent l'utilisation de substances de croissance. Aussi la revue des travaux relatifs au métabolisme des tissus isolés sera-t-elle suivie de l'exposé des recherches concernant l'action de ces substances sur différents organes végétaux. Enfin, les propriétés physiologiques des tissus de crown-gall seront examinées.

I. — LE MÉTABOLISME DES TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS *in vitro*

Les connaissances que nous avons de la morphologie, de l'histologie et des conditions de croissance des tissus végétaux cultivés *in vitro* ont été exposés par GAUTHERET en 1945. Depuis WHITE (1951) et GAUTHERET (1955 b) ont analysé les travaux relatifs à la physiologie de ces tissus. Le premier Colloque sur la physiologie des cultures de tissus végétaux a eu lieu à Briançon en juillet 1954 (1) (2).

Les paragraphes suivants concernent quelques aspects du métabolisme des tissus cultivés *in vitro*.

1° Le métabolisme azoté.

RIKER et GUTSCHE (1948) ont constaté que seuls les nitrates et l'urée assurent une bonne croissance des tissus de crown-gall de Tournesol. L'ammoniaque, les nitrites, les acides aminés, inhibent la prolifération cellulaire. Cette inhibition se manifeste même en présence de nitrates. Les trois acides aminés participant le plus activement aux réactions de transamination (acide glutamique,

(1) *L'Année biologique*, 1954, **30**, p. 261-460 ; 1955, **31**, p. 1-241.

(2) Le nouveau traité de GAUTHERET (1959) fait le point sur tous les problèmes relatifs aux cultures de tissus végétaux.

acide aspartique, α -alanine) présentent un phénomène curieux ; ils inhibent la croissance en présence de nitrates lorsqu'ils sont à la concentration de 0,001 M, mais l'inhibition disparaît lorsque leur concentration atteint 0,064 M.

EBERTS, BURRIS et RIKER (1954) essaient de préciser ce phénomène en étudiant l'activité des transaminases des tissus ainsi que l'assimilation de nitrates ou d'acides aminés marqués par ^{15}N . Ils ne trouvent pas de parallélisme entre l'activité des transaminases et la croissance des tissus. Avec les milieux contenant de l' α -alanine ou de l'acide glutamique marqués, ^{15}N est retrouvé dans ces deux acides aminés, ainsi que dans l'acide aspartique, la thréonine, la sérine, la méthionine et la phénylalanine.

STEWART, CAPLIN et MILLAR (1952) mesurent les quantités d'azote soluble et d'azote insoluble des tissus de Carotte cultivés en présence de lait de Coco. L'azote insoluble croît très vite au début de la culture, puis plus lentement.

SILBERGER et SKOOG (1953), SKOOG (1955) ont montré que l'acide indolacétique favorise la synthèse des acides ribo et désoxyribonucléique dans des fragments de moelle de Tabac.

Quelques recherches récentes ont étudié plus particulièrement le métabolisme protidique des tissus cultivés *in vitro*.

Les protéines des tissus de Carotte et de Pomme de terre en croissance active sont caractérisées par une teneur en hydroxyproline très élevée (STEWART et POLLARD, 1956), (STEWART, THOMPSON et POLLARD, 1958).

A l'aide de molécules marquées par ^{14}C , STEWARD, BIDWELL et YEMM (1956, 1958) ont étudié le métabolisme de la glutamine et de l'acide γ -aminobutyrique des tissus de Carotte croissant activement sur un milieu contenant du lait de Coco, ou au contraire croissant très lentement sur un milieu dépourvu de substance de croissance. Vingt-quatre heures après l'absorption de glutamine uniformément marquée, de très nombreux acides aminés ainsi que le CO_2 émis sont radioactifs. Un examen approfondi des activités spécifiques des métabolites radioactifs permet de calculer les proportions de glutamine absorbée, synthétisée *de novo* dans les tissus, utilisée dans les synthèses d'autres métabolites, ou bien dégradée. Dans les tissus croissant activement, les synthèses sont plus importantes que les dégradations. Après l'absorption d'acide γ -aminobutyrique radioactif par les tissus, l'acide glutamique et la glutamine sont marqués.

Les tubercules de Topinambour sont des organes très riches en arginine libre. Lorsque des fragments sont cultivés *in vitro*, les teneurs en arginine diminuent alors que les teneurs en acide glutamique et proline à l'état libre s'élèvent (DURANTON, 1956), (DURANTON et MOREL, 1958).

La région cambiale des tubercules de Carotte est très riche en acides aminés libres. Les cals obtenus après culture *in vitro* sont plus pauvres (MENORET, 1957).

Les tissus de tige de *Citrus limonum* contiennent une très grande quantité de proline à l'état libre. Par ailleurs, une carence en potassium est suivie de l'augmentation de teneur en acide γ -aminobutyrique (RAVEUX, M. et Mme BOVÉ, 1957).

2° Le métabolisme glucidique.

Le simple fait de maintenir des fragments de Carotte ou de Topinambour sur un milieu dépourvu d'aliment carboné provoque une diminution progressive de la quantité de glucides solubles des tissus. En présence d'acide ind lacétique, cette diminution est plus rapide (COVA, 1942, 1943 — GORIS, 1947 a et b, 1948 a et b).

Si le milieu contient des glucides, ceux-ci sont absorbés par les tissus et s'y accumulent (COVA, 1942, 1943). La présence d'auxine favorise cette accumulation dans les tissus de Carotte (GORIS, 1954 — WIGGANS, 1954) et les fragments de moelle de Tabac (SKOOG et ROBINSON, 1950).

Les transformations mutuelles des principaux glucides sont facilement mises en évidence avec les tissus cultivés *in vitro*. Les tissus de Carotte ou de crown-gall de Vigne synthétisent le saccharose aussi bien à partir de glucose que de fructose (GORIS, 1954). Les tissus de *Sequoia sempervirens* peuvent utiliser le mannose, le galactose, le raffinose ou le lactose et convertir ces différents oses ou osides en glucose, fructose et saccharose (BALL, 1955).

GORIS (1950) observe la disparition des glucides réducteurs des tissus de Carotte cultivés en présence de fortes concentrations de lait de Coco. Dans les mêmes conditions, WIGGANS (1954), sans obtenir leur disparition totale, constate cependant une diminution de la quantité de ces glucides. GORIS et DUHAMET (1958) ont étudié l'action de fortes concentrations de lait de Coco (10 à 100%) sur les teneurs en glucides de nombreux tissus végétaux. En général le lait de Coco provoque une diminution des teneurs en glucides. Cette diminution atteint les réducteurs libres pour les tissus de Carotte, les glucofructosanes pour les tissus sains de Topinambour, le saccharose pour les tissus de crown-gall de Topinambour, toutes les formes glucidiques pour les tissus de crown-gall de Scorsonère.

L'action de l'hydrazide maléique a été particulièrement étudiée. Cette substance provoque une augmentation de la teneur en saccharose et une diminution de la teneur en inuline des tissus de Topinambour (GORIS et PHOUPHAS, 1952). Avec les tissus de Carotte, PHOUPHAS (1952) ne constate l'élévation de la quantité de saccharose qu'au début de la culture. Seules les faibles doses d'hydrazide maléique provoquent réellement l'accumulation du

diholosite (GORIS et BOURIQUET, 1953 — PHOUPHAS, 1955). L'hydrazide maléique ralentit la disparition du saccharose dans les tissus de Betterave maintenus en culture (RICHEZ et GAUTHERET, 1954).

3° Les échanges gazeux respiratoires.

L'intensité respiratoire exprimée par rapport au poids de substance sèche (IRs) (1) de tissus de *Salix capraea* augmente dès le début de la culture, atteint son maximum entre le 4^e et le 8^e jour, puis diminue. Après 50 jours, les valeurs sont inférieures à celles du début (PLANTEFOL, 1938). L'augmentation temporaire de l'IRs est très sensible avec un milieu glucosé; elle est visible, quoique moins accentuée avec un milieu purement minéral (PLANTEFOL et GAUTHERET, 1939). En 1941, PLANTEFOL et GAUTHERET comparent, après différentes périodes de croissance des colonies, les intensités respiratoires des tissus primitifs et celles des tissus néoformés. Comme ces derniers sont plus riches en eau, les intensités respiratoires exprimées par g de substance fraîche (IRf) sont voisines dans les deux cas alors que l'IRs des tissus néoformés est plus élevée que celle des tissus primitifs. Il en est de même avec des tissus de Carotte.

LACHAUX (1944 a, b, c, d) étudie l'intensité respiratoire des tissus de tubercules de Carotte et de Topinambour. Il vérifie d'abord l'influence stimulatrice bien connue des traumatismes sur l'intensité respiratoire (BOUILLENNE et BOUILLENNE-WALRAND, 1926 — AUDUS, 1935, 1939, 1941). Des cossettes de 1 mm d'épaisseur découpées dans un tubercule de Topinambour ont une IRf deux fois plus élevée que celle obtenue avec de gros fragments d'un tubercule identique. La présence de 4% de glucose dans le milieu double en 4 jours l'IRf des fragments de Carotte et de Topinambour. L'acide indolacétique aux concentrations de 10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} ne modifie pas les échanges gazeux de tissus de Carotte, mais exalte considérablement l'IRf de tissus de Topinambour. Avec 10^{-5} , les valeurs de l'IRf diminuent pour les tissus des deux espèces. LACHAUX retrouve également l'évolution de l'IRs en fonction du temps telle que l'a décrite PLANTEFOL.

Les recherches qui viennent d'être décrites ont toujours porté sur des cultures entières et les mesures ont été faites à l'aide des méthodes eudiométriques. Les chercheurs américains, dont les travaux sont exposés maintenant, ont utilisé généralement

(1) Dans la suite de cet exposé, IRs désigne l'intensité respiratoire définie par le volume de gaz émis (CO_2) ou absorbé (O_2) par heure rapportée à l'unité de poids de substance sèche; IRf désigne l'intensité respiratoire rapportée à l'unité de poids de substance fraîche.

la méthode manométrique de Warburg. Dans cette méthode, les tissus sont préalablement découpés en tranches minces, d'épaisseur souvent inférieure au mm. Les tranches sont mises au contact d'une solution contenant un aliment respiratoire (glucose, citrate, etc.) et éventuellement la substance dont on désire étudier l'action. La concentration intracellulaire des substances prélevées dans le milieu est fonction de l'épaisseur des fragments. Les résultats obtenus avec des tranches très minces ne peuvent donc servir sans critique à l'interprétation de la physiologie de colonies entières. Les conditions dans lesquelles les mesures sont effectuées diffèrent donc beaucoup des conditions de culture. Il est nécessaire de tenir compte de ce fait dans l'interprétation des résultats.

MITCHELL, BURRIS et RIKER (1949) étudient les échanges gazeux de divers organes végétaux et de tissus de crown-gall de Tournesol, en présence de fortes concentrations (2×10^{-3} M) d'acide indolacétique ou d'acide 2 - 4 dichlorophénoxyacétique (2 - 4 D). Ils observent une diminution de l'intensité respiratoire exprimée par mg d'azote total.

NEWCOMB (1950) mesure la respiration de tissus tumoraux de Tabac. Il constate que les tissus âgés de trois mois ont une IRs inférieure à celle des tissus âgés d'un mois. Le 2-4 dinitrophénol, à la concentration de 10^{-4} M, provoque une augmentation de l'IRs.

NICKELL (1950) étudie l'influence de diverses auxines et de la colchicine sur l'accroissement du poids de substance fraîche et sur l'intensité respiratoire de tumeurs de *Rumex Acetosa* induites par un virus. La même concentration d'acide indolacétique (0,01 p.p.m.) provoque le plus grand accroissement et la plus forte IRf. Avec le 2-4 D et l'acide naphthoxyacétique, les poids les plus élevés sont obtenus avec des concentrations de 0,01 p.p.m., 100 fois plus faibles que celles nécessaires à l'obtention des intensités respiratoires maximums (1 p.p.m.).

EBERTS, BURRIS et RIKER (1951) constatent qu'une très forte concentration d'acide indolacétique diminue d'environ 50% l'intensité respiratoire des tissus sains et tumoraux de Tomate. Cette inhibition n'est pas supprimée si l'on ajoute au milieu les acides organiques du cycle de Krebs.

STEWART, CAPLIN et MILLAR (1952), lors d'une étude sur la croissance des fragments de liber de Carotte en présence de lait de Coco, mesurent par dosage du CO_3 K_2 formé en présence de potasse, la quantité totale de CO_2 émis par des tissus de Carotte en culture. Cette quantité augmente en fonction du temps. Aucun calcul d'intensité respiratoire n'a été fait par les auteurs.

4° *L'activité de quelques oxydases.*

NEWCOMB (1951, 1955) étudiant l'action de l'acide indolacétique sur des disques de moelle de Tabac cultivés *in vitro*, observe une augmentation de l'activité de l'acide ascorbique-oxydase des broyats et, simultanément, une exaltation de la respiration et un élargissement des cellules. L'oxydase est localisée dans les membranes, aussi NEWCOMB souligne-t-il le rapport possible entre ces faits et l'action de l'auxine sur les substances membranaires.

L'acide indolacétique, le 2-4 D et l'hydrazide maléique provoquent une diminution de l'activité catalasique des tissus de Topinambour (MOREL et DEMETRIADES, 1955). La pénicilline G favorise à la fois la croissance et l'activité catalasique des mêmes tissus (CAMUS et LANCE, 1955).

L'activité peroxydasique des tissus de Topinambour est augmentée par l'acide indolacétique, diminuée par l'hydrazide maléique. Elle n'est pas modifiée par le 2 — 4 D (MOREL et DEMETRIADES, 1955). La pénicilline G augmente cette activité (CAMUS et LANCE, 1955).

L'activité polyphénoloxydasique des mêmes tissus est exaltée par l'acide indolacétique, le 2-4 D et l'hydrazide maléique (MOREL et DEMETRIADES, 1955). La pénicilline G provoque une augmentation de l'activité dopa-oxydasique (CAMUS et LANCE, 1955).

Tous ces faits ne permettent pas de dégager des rapports simples entre la croissance et les activités enzymatiques. Celles-ci sont généralement exprimées par rapport au poids de substance fraîche. Or, les diverses substances testées peuvent provoquer des accroissements de poids d'origine différente. En effet, leur action peut se manifester tantôt sur l'hydratation, tantôt sur l'augmentation de la masse protoplasmique sèche (LANCE, 1956).

5° *Le rendement de croissance des tissus cultivés in vitro.*

KANDLER (1953 a et b, 1955) a mesuré, avec des tissus accoutumés de Vigne, le « Coefficient d'efficacité synthétique » de SIEGEL et CLIFTON (1950 a et b). Ce coefficient est défini par le rapport :

$$\frac{\text{Carbone du milieu assimilé}}{\text{Carbone rejeté sous forme de CO}_2}$$

Ce rapport exprime le rendement de l'utilisation de l'aliment carboné. Il est très voisin, quant à sa signification, des différents coefficients proposés antérieurement par PFEFFER (1895), RUBNER (1906), TAMIYA (1932, 1935).

KANDLER procède de la manière suivante :

— 1° La quantité de glucose assimilé est déduite de l'augmentation du poids de la substance sèche.

— 2° La quantité de glucose oxydé est calculée par différence entre la quantité de glucose disparu du milieu et la quantité de glucose assimilé.

Des mesures d'intensités respiratoires confirment les valeurs calculées pour le glucose oxydé. KANDLER constate ainsi que le lait de Coco, non seulement accélère la croissance du tissu accoutumé de Vigne, mais encore en augmente le rendement. Avec une concentration en lait de Coco de 10%, le *Coefficient d'efficacité synthétique* est en moyenne deux fois plus grand que le coefficient des témoins. Toutefois, les résultats obtenus sont très variables : certains témoins présentent une diminution de leur poids de substance sèche en fin d'expérience.

KANDLER a calculé également les *Coefficients d'efficacité synthétiques* de divers organes (racines de Maïs et d'Asperge) et d'embryons (Maïs, Frêne). Il a montré que, pour les embryons de Frêne, les coefficients sont plus élevés au début qu'en fin de croissance.

6° *Le métabolisme des substances membranaires.*

L'acide indolacétique provoque une exaltation de l'activité de la pectine-méthylestérase de tissus de moelle de Tabac (BRYAN et NEWCOMB, 1954). Cet enzyme est localisé dans les membranes, comme l'acide ascorbique-oxydase. D'après WILSON et SKOOG (1954), la synthèse des composés pectiques insolubles, à partir des polyuronates solubles, est activée par l'acide indol-acétique. NEWCOMB estime que l'action de l'auxine débute par une augmentation de la plasticité de la membrane due à une dégradation temporaire de la lamelle moyenne. Cependant, l'auxine est sans effet sur l'activité de la polygalacturonase (NEWCOMB, 1955).

II. — L'ACTION DES DIVERSES SUBSTANCES DE CROISSANCE SUR LE MÉTABOLISME VÉGÉTAL

1° *L'action des auxines.*

Le très grand nombre d'études portant sur le mode d'action des auxines sur le métabolisme des végétaux supérieurs rend difficile leur analyse succincte. Ces études sont décrites dans des ouvrages généraux (PINCUS et THIMANN, 1948 ; AUDUS, 1953), diverses mises au point (AUDUS, 1949 ; BONNER et BANDURSKI, 1952 ; AUDUS, 1954), ainsi que dans des comptes rendus de colloques (SKOOG, 1951 ; WAIN et WIGHTMAN, 1956).

Deux faits ressortent avec certitude :

a) En présence d'auxines, les organes de tissus végétaux présentent une augmentation de l'absorption de l'eau (SÖDING, 1931; HACKETT et THIMANN, 1952 a et b).

b) L'augmentation de l'absorption d'eau s'accompagne d'une élévation des échanges gazeux respiratoires (REINDERS, 1938; COMMONER et THIMANN, 1941; HACKETT et THIMANN, 1952 a et b; BONNER, BANDURSKI et MILLERD, 1953).

2° L'action du lait de Coco.

En 1942, VAN OVERBEEK, CONKLIN et BLAKESLEE réussissent la culture *in vitro* d'embryons isolés de *Datura*, avec un milieu contenant du lait de Coco.

CAPLIN et STEWARD (1948) mettent en évidence l'action très favorable de ce produit sur la croissance des fragments de liber de Carotte. DUHAMET (1949, 1950 a et b, 1951 a et b) retrouve cette action stimulante sur un très grand nombre de tissus, dont les crown-galls pratiquement insensibles aux auxines. L'agent actif du lait de Coco est donc une substance différente. Depuis, l'utilisation du lait de Coco a permis de cultiver *in vitro* un très grand nombre de tissus végétaux qui n'avaient pu l'être auparavant : tissus de Monocotylédones (MOREL, 1950) et de Gymnospermes (TULEKE, 1953).

Comme les auxines, le lait de Coco favorise l'absorption de l'eau, mais il ralentit nettement l'absorption des sels par des tissus de Carotte (STEWART, CAPLIN et MILLAR, 1952).

STEWART et SHANTZ (1954, 1955) ont tenté d'isoler le principe responsable de l'exaltation de la croissance. Après de multiples fractionnements, ils ont isolé 4 substances cristallisées actives désignées par les lettres A, B, C et F, et deux substances inhibitrices désignées par les lettres D et E. L'action stimulante des substances A, B, C, et F n'est mise en évidence que si le milieu contient de l'hydrolysate de caséine. Le composé A est identifié à la 1-3 diphényle-urée (SHANTZ et STEWARD, 1955). L'action du lait de Coco résulte de l'activité synergique de ses multiples constituants. Des substances catalytiques comme la diphényle-urée favorisent l'utilisation des substances trophiques comme les acides aminés. Ainsi comprend-on l'action positive des constituants A, B, C et F en présence de l'hydrolysate de caséine. PARIS et DUHAMET (1953) confirment en effet ce point de vue. Avec des tissus de crown-gall de Scorsonère, cultivés sur un mélange synthétique d'acides aminés et de vitamines, ou cultivés sur lait de Coco, ils obtiennent des accroissements identiques. Les résultats sont moins nets avec des tissus de Carotte (PARIS, DUHAMET et GORIS 1954).

3° L'action de l'hydrazide maléique.

SCHOENE et HOFFMAN (1949) montrent que l'hydrazide maléique inhibe la croissance des végétaux supérieurs, sans provoquer de malformations ou de nécroses. Cette substance a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. En 1955, BERTOSSI en comptait déjà plus d'une centaine. Je me bornerai à en signaler quelques-uns parmi les plus caractéristiques.

L'application de solutions d'hydrazide maléique est généralement suivie d'une inhibition des diverses phases du développement des Végétaux ; il en est ainsi de la floraison du Tabac et du Maïs (NAYLOR, 1950 ; JOSEPHSON, 1951), de la fructification de diverses plantes (WHITE D.G., 1950), de la germination de bulbes d'Oignons et de tubercules de Carotte (WITTWER, SHARMA, WILLER et SELL, 1950). Le traitement par l'hydrazide maléique provoque fréquemment la formation de pigments anthocyaniques (TATUM et CURME, 1951 ; GREULACH, 1951). Il entraîne aussi une diminution des échanges gazeux respiratoires (NAYLOR et DAVIS, 1950). Les plantes traitées ont souvent une teneur en glucides plus élevée ; il en est ainsi pour le Coton (MAC ILRATH, 1950), la Betterave à sucre (WITTWER et HANSEN, 1951), et le Maïs (NAYLOR, 1951).

L'action inhibitrice de l'hydrazide maléique sur la croissance de tissus cultivés *in vitro* a été montrée par BERTOSSI et CAPOZZI (1951). L'inhibition peut être levée par addition d'acide indol-acétique (GAUTHERET, 1952 ; BERTOSSI et CAPOZZI, 1952). LEOPOLD et KLEIN (1951, 1952) estiment que l'hydrazide maléique agit par antagonisme direct avec l'auxine. Pour ANDREAE (1954), l'hydrazide maléique activerait l'oxydation de l'acide indolacétique, mais KULESCHA (1953, 1954) trouve les mêmes quantités d'auxine endogène dans des tissus de Topinambour et de crown-gall de Scorsonère, qu'ils soient cultivés en présence de fortes concentrations d'hydrazide maléique ou non.

III. — LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES TISSUS DE CROWN-GALL

Les tumeurs végétales induites par l'*Agrobacterium tumefaciens* ont été mises en évidence par SMITH E. F. (1911). Elles ont fait l'objet de multiples travaux analysés dans les mises au point présentées par LINK (1932), GAUTHERET (1949), BRAUN (1954 a), KLEIN et LINK (1955), CAMUS (1956).

Aussi seules seront exposées les propriétés physiologiques des tissus de crown-gall.

WHITTE et BRAUN (1941, 1942) ont réalisé la culture *in vitro*

de tumeurs secondaires d'*Helianthus annuus*. Ces tumeurs, dépourvues de la Bactérie inductrice, provoquent le développement de nouvelles tumeurs, lorsqu'elles sont greffées sur des plantes saines. Une fois déclenché, le processus tumoral persiste en dehors de toute action bactérienne.

Le très grand pouvoir de prolifération est une des principales propriétés des tissus de crown-gall. Il doit être partiellement dû à leur grande teneur en auxines. LINK et EGGERS (1941) ont montré que les tumeurs primaires sont beaucoup plus riches en auxines que les tissus sains voisins. KULESCHA (1951), HENDERSON et BONNER (1952) ont fait les mêmes observations à propos des tissus tumoraux cultivés *in vitro*. Ces tissus, n'ont pas besoin de substances de croissance dans leur milieu de culture (GAUTHERET, 1948). Les auxines des tissus tumoraux sont identiques aux auxines des tissus sains (BITANCOURT, 1954).

Les tissus des tumeurs primaires ont une composition chimique et une activité métabolique identiques à celles de tissus sains se divisant activement (méristème par exemple). Par rapport aux tissus sains voisins, dont les cellules ne se divisent généralement pas (entre-nœuds de tiges le plus souvent), les tumeurs sont plus riches en substances azotées (BERTHELOT et AMOUREUX, 1936 ; NAGY, RIKER et PETERSON, 1938 ; NEISH et HIBBERT, 1943 b), en composés phosphorés (MANIGAULT et JUSSIER, 1951 ; KLEIN 1952). Les glucides y sont rapidement utilisés pour la formation d'autres substances (NEISH et HIBBERT, 1940). L'intensité respiratoire est plus élevée et le quotient respiratoire supérieur à 1 (NEISH et HIBBERT, 1943 a ; KLEIN, 1952). Les différences obtenues entre les tumeurs et les tissus sains voisins sont essentiellement dues au caractère proliférant des premières et non à leur caractère tumoral. Il est nécessaire de comparer les tissus tumoraux à des tissus sains dont la croissance est active. La méthode de culture des tissus *in vitro* permet cette comparaison.

Ainsi KLEIN (1957) constate que l'IRs de tissus tumoraux de *Parthenocissus tricuspidata* cultivés *in vitro* est plus faible que celle de tissus sains correspondants.

L'activité catalasique des tissus tumoraux de diverses espèces est plus faible que celle des tissus sains correspondants (GALSTON, 1951).

LEE (1952) ne trouve aucune différence qualitative entre les acides aminés provenant d'hydrolysats totaux de tissus normaux, de tissus accoutumés et de crown-gall de Vigne. La teneur en protéines des tissus de crown-gall est cependant plus élevée que celle des tissus sains.

MOREL (1956, 1959) a mis en évidence, parmi les acides aminés libres de tissus tumoraux de Topinambour, plusieurs compo-

sés possédant un radical guanidyle, parmi lesquels l'acide guanido-butyrique. Ces composés ne se retrouvent pas dans les tissus sains correspondants.

SCOTT, BURRIS et RIKER (1955) ont trouvé les mêmes acides organiques dans les tissus sains et tumoraux.

HENDERSON et BONNER (1952) ont montré que la quantité de tryptophane libre est très faible dans les tissus tumoraux de Soleil ; elle est au contraire assez élevée dans les tissus sains. Pour les deux sortes de tissus, la quantité de tryptophane des hydrolysats protéiques est élevée. HENDERSON et BONNER rapprochent ces faits de la haute teneur en auxines des tissus tumoraux et de l'hétérotrophie des tissus sains à l'égard des substances de croissance. Ils concluent qu'il existe chez ces derniers un inhibiteur empêchant la synthèse de l'acide indolacétique à partir du tryptophane.

Par électrophorèse des protéines solubles de tissus tumoraux de Soleil et de Tabac, CAMUS, WILDMAN et BONNER (1951) ont mis en évidence un pic très caractéristique que l'on ne retrouve pas avec les protéines des tissus normaux correspondants.

CHAPITRE II

SYNTHÈSES ET DÉGRADATIONS AU COURS DE LA CROISSANCE DE TISSUS VÉGÉTAUX CULTIVÉS IN VITRO

I. — MÉTHODES ET TECHNIQUES

A. — CULTURE DES TISSUS.

Toutes les cultures ont été réalisées selon les méthodes de GAUTHERET. Je me bornerai à donner quelques indications sur la nature des milieux utilisés, sur le choix des tissus, ainsi que sur la détermination de la taille des fragments ensemencés ou repiqués.

1° *Milieux de culture.*

Le milieu de base comprend :

- la solution de KNOP diluée de moitié ;
- du KCl (0,12%) (1) ;
- les oligo-éléments de la solution de BERTHELOT modifiée par GAUTHERET (1942 c) (2) ;
- de la gélose (1,1%) ;
- du glucose (3% pour les fragments de tubercules de Scorsonère, 5% pour les colonies de crown-gall de Scorsonère) ;
- du chlorhydrate de cystéine (10^{-5}) ;
- de l'aneurine (10^{-5}).

Les différentes substances de croissance sont ensuite ajoutées.

(1) L'addition de KCl est préconisée par HELLER (1948) qui a montré l'action favorable des ions K^+ sur la prolifération des tissus végétaux. Depuis, HELLER (1953) a réalisé un milieu type beaucoup plus favorable. Mais, comme l'a souligné GAUTHERET (1955 a), les changements de milieu provoquent des augmentations de la variabilité physiologique des tissus. J'ai donc préféré conserver dans toutes mes expériences le milieu utilisé lors de mes premiers essais.

(2) Bien que ce milieu soit dépourvu de molybdène, il n'a jamais été constaté de déficience apparente dans la réduction des nitrates. On peut donc penser que les quantités de molybdène présent dans les explantats ou bien dans les impuretés des sels ou de la gélose ont toujours pu satisfaire les besoins des fragments ou des colonies.

2° Tissus cultivés.

Deux sortes de tissus sont cultivés :

— 1° Des fragments isolés de xylème de tubercules de *Scorzonera Hispanica* L., variété « géante de Russie ». Seules sont utilisées les racines dont le diamètre est compris entre 1,75 et 2,25 cm. Aucun prélèvement n'a été fait dans les parties proches du collet et de la pointe.

L'examen des résultats montrera l'homogénéité des caractères physiologiques des fragments utilisés dans une même expérience (comparaison des valeurs obtenues pour les différents lots de tissus après 24 heures). L'homogénéité est moins bonne lorsque l'on compare des tissus utilisés dans les différentes expériences. Bien que les expériences soient faites pendant la période hivernale (de décembre à mars), la variabilité des diverses caractéristiques physiologiques des tissus peut se manifester. Ainsi KULESCHA (1951) a montré que la teneur en auxines des tubercules de Topinambour varie d'octobre en avril.

— 2° Des colonies tissulaires provenant d'une souche de crown-gall de Scorsonère, isolée par GAUTHERET (GAUTHERET, 1948). Bien que les tissus utilisés pour les différentes expériences soient alors génétiquement identiques, de légères variations saisonnières se manifestent également dans leurs propriétés physiologiques (HELLER, 1953).

3° Volume et poids des fragments cultivés.

Afin que les fragments initiaux de tissus soient aussi semblables que possible, des volumes identiques et de même forme sont prélevés (DUHAMET, 1953).

Le xylème des tubercules est découpé en parallélépipèdes de $1,5 \times 0,7 \times 0,7$ cm. Le poids moyen des parallélépipèdes est de 703 mg avec un écart maximum de + 23 mg et un écart type de + 3,1 mg.

Les colonies tissulaires de Crown-gall sont débitées en cubes de 0,5 cm de côté, le poids moyen des cubes est de 120 mg avec un écart maximum de + 12 mg et un écart type de + 9,3 mg.

Les écarts, calculés pour 10 fragments pris au hasard sont inférieurs à 5% pour les fragments de tubercule et à 10% pour les colonies de crown-gall. La méthode permet d'éviter la pesée aseptique de chaque fragment.

B. — MESURE DES ÉCHANGES GAZEUX RESPIRATOIRES.

Chaque lot de tissus, après la durée de culture choisie, est retiré du milieu. Les colonies sont lavées à l'eau courante afin

d'éviter les oxydations extrinsèques (PLANTEFOL, 1937 a et b). Elles sont essorées avec du papier filtre puis pesées. Les colonies sont ensuite placées dans des enceintes respiratoires. Elles se trouvent alors en atmosphère confinée et saturée de vapeur d'eau. Trois enceintes différentes sont utilisées pour une même catégorie de tissus, de sorte que les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des trois mesures.

Pour assurer l'identité de l'atmosphère initiale dans toutes les enceintes, la pression y est abaissée à 150 mm de Hg environ, puis de l'air extérieur y est réintroduit. Le choix de la pression de 150 mm de Hg tient compte des observations de PLANTEFOL (1938) qui a constaté que les cultures de cambium de Saule, soumises à une pression de 80 mm de Hg, demeurent parfaitement vivantes, mais ne s'accroissent plus. Ces faits ont été confirmés par des essais préliminaires. Des lots de tissus, une semaine après ensemencement, sont soumis aux dépressions suivantes : 18 mm de Hg, 80 mm de Hg, 150 mm de Hg, 200 mm de Hg. La pression atmosphérique est ensuite rétablie. L'accroissement du poids de substance fraîche est comparé trois semaines plus tard avec celui d'un lot de même tissu n'ayant pas été soumis à l'effet d'un vide partiel. On constate que les dépressions correspondant à 18 et 80 mm de Hg ralentissent l'accroissement des tissus respectivement de 40% et de 15%. Aucun ralentissement n'est constaté avec les pressions supérieures.

Les enceintes sont portées à l'obscurité, à la température constante de 18° C. La durée de séjour et la quantité des colonies sont préalablement déterminées de telle façon que l'atmosphère interne en fin d'expérience renferme une quantité de CO₂ voisine de 1% en volume (supérieure à 0,5% et inférieure à 2%). La durée, généralement de l'ordre de 5 à 7 heures, n'a jamais dépassé 10 heures.

Les gaz sont extraits et leur quantité est déterminée selon les techniques décrites par PLANTEFOL et MOYSE (1948). Le CO₂ et l'O₂ sont finalement dosés à l'aide de l'eudiomètre simplifié de PLANTEFOL (1933). Les volumes de CO₂ émis et d'O₂ absorbé sont déterminés et leurs valeurs ramenées à la température de 0° C et à la pression de 760 mm de Hg.

Si l'on excepte les colonies pour lesquelles les mesures sont faites aussitôt après les opérations d'ensemencement ou de repiquage, l'effet des lésions est négligeable, puisque le découpage initial mis à part, les tissus ne sont jamais sectionnés. Les valeurs obtenues correspondent bien à des échanges gazeux intra-cellulaires.

C. — ANALYSE DES GROUPES DE SUBSTANCES AZOTÉES.

Les techniques utilisées ont été décrites de façon détaillée par MOYSE¹ (1950, a). Aussi seule la marche générale des manipulations sera indiquée.

1° *Dessiccation et extraction.*

Après extraction des gaz, les tissus sont recueillis, puis desséchés pendant 12 heures à l'étuve à 70°C sous un courant d'air. Ils sont ensuite maintenus sous vide, en présence de P_2O_5 , à la température ambiante jusqu'à poids constant. Le poids de substance sèche est alors déterminé.

Après broyage des tissus secs, les composés solubles sont extraits à trois reprises par l'alcool à 50° G.L. à chaud (80°C). La liqueur hydroalcoolique est séparée du résidu insoluble par filtration.

2° *Dosage des différents groupes.*

— Le résidu insoluble est minéralisé et l'azote dosé selon KJELDAHL.

— La liqueur hydroalcoolique est fractionnée en plusieurs parties aliquotes avec lesquelles on procède aux dosages suivants :

a) N soluble total, dosé selon KJELDAHL. Si la liqueur contient des nitrates, ceux-ci sont préalablement réduits par H_2 , obtenu par action de l'acide phénylsulfurique sur Zn.

b) N du précipité obtenu après addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 20%.

c) N nitrique, selon la méthode de BACH (1933).

Les différents dosages permettent de déterminer la répartition de l'azote dans les principaux groupes suivants.

a) *N protéique* = N insoluble + N du précipité trichloracétique (1).

b) *N soluble organique* (2) = N soluble total — (N nitrique + N du précipité trichloracétique). Cette fraction correspond principalement aux acides aminés, aux amides et aux peptides.

(1) L'extraction à l'alcool à 50° G.L., dans les conditions indiquées, ne solubilise que très peu d'N protéique. L'N du précipité trichloracétique ne correspond qu'à environ 0,5% de ce dernier.

(2) L'ion ammonium n'a jamais pu être décelé.

D. — ANALYSES DES GLUCIDES SOLUBLES.

Les glucides présents dans les tissus de réserve des Composées comprennent essentiellement le glucose, le fructose et une série de glucofructosanes condensés dont le premier terme est le saccharose et le dernier l'inuline (DEDONDER, 1952).

1° Fixation et extraction.

Après stabilisation dans l'alcool à 95° G.L. à l'ébullition en présence de CO_3Ca , les tissus sont séchés et broyés. Les glucides sont extraits à trois reprises par de l'eau bouillante.

Les liqueurs de fixation et d'extraction sont réunies et concentrées sous pression réduite à une température inférieure à 50°C. Le résidu sirupeux est repris par l'eau et déféqué avec une quantité minimum d'acétate de Pb basique.

L'excès du Pb est éliminé par addition de SO_4Na_2 . Après filtration et rinçage, le volume est ajusté à une valeur déterminée.

2° Dosages.

Les glucides réducteurs libres sont dosés directement par la méthode de BERTRAND, chaque fois que les quantités le permettent. Sinon, la méthode de SOMOGYI (1937) est utilisée, en prenant les précautions indiquées par MOYSE (1950, a).

L'hydrolyse acide est faite en portant 20 cm³ de la liqueur à pH 2 par addition d'une ou deux gouttes d'HCl et en laissant 10 minutes au bain-marie à l'ébullition. La liqueur est ensuite neutralisée par la soude, ramenée à un volume de 20 cm³ et dosée selon BERTRAND.

L'invertase utilisée pour l'hydrolyse enzymatique est extraite de la Levure de boulangerie par la méthode de BOURQUELOT. Des essais préliminaires permettent de déterminer la durée minimum nécessaire pour obtenir l'hydrolyse totale d'une solution de saccharose sensiblement voisine de celle présente dans les liqueurs. Cent mg de la préparation d'invertase sont laissés 24 heures au contact de 50 cm³ de liqueur additionnée de quelques gouttes de toluène, en flacon bouché, à 37°C. La liqueur est ensuite filtrée. Les glucides réducteurs obtenus sont dosés selon BERTRAND.

3° Signification des dosages des glucides.

Le dosage direct donne la quantité de glucides réducteurs libres. Le dosage après hydrolyse acide donne la quantité de glucides solubles totaux (réducteurs libres + saccharose + glucofructosanes condensés). Les conditions d'hydrolyse (pH 2, 100°C, 10 minutes) ne permettent pas l'hydrolyse sensible des matières

membranaires (pectines et autres polyuronates) qui peuvent être entraînées par l'extraction aqueuse.

Si l'invertase catalyse l'hydrolyse du saccharose, elle provoque aussi, quoiqu'à une plus faible vitesse, l'hydrolyse des glucosfructosanes de poids moléculaire faible (DEDONDER, 1952). Les valeurs obtenues après l'hydrolyse enzymatique, diminuées des valeurs obtenues après dosage direct, ne correspondent donc pas rigoureusement à la quantité de saccharose. Cependant, les expressions suivantes sont utilisées et les quantités de glucides sont toujours exprimées en mg de glucose.

1°) *Réducteurs libres* = réducteurs après dosage direct.

2°) *Saccharose* = réducteurs après hydrolyse enzymatique — réducteurs après dosage direct.

3°) *Glucosfructosanes* = réducteurs après hydrolyse acide — réducteurs après hydrolyse enzymatique.

4°) *Glucides totaux* = réducteurs après hydrolyse acide.

E. — MODES D'EXPRESSION DES RÉSULTATS.

1° *Expression des échanges gazeux respiratoires.*

L'intensité des échanges gazeux est définie par le volume de CO_2 émis par unité de temps. Chaque mesure permet trois modes d'expression de l'intensité respiratoire. Ces modes d'expression sont désignés et définis ainsi :

— IRc = mm^3 de CO_2 émis par heure et par *colonie tissulaire*.

— IRs = mm^3 de CO_2 émis par heure et par *g de substance sèche*.

— IRNp = mm^3 de CO_2 émis par heure et par *mg d'N protéique*.

Le quotient respiratoire (QR) est défini par le rapport :

$$\frac{\text{CO}_2 \text{ émis}}{\text{O}_2 \text{ absorbé}}$$

2° *Expression des résultats des analyses des constituants cellulaires.*

Les résultats des analyses des constituants azotés et glucidiques sont rapportés :

— soit au nombre de colonies, les valeurs obtenues exprimant alors les « *quantités* » de la substance analysée contenue dans une colonie.

— soit au poids de substance sèche $\times 100$, les valeurs obtenues exprimant alors les « *teneurs* » des tissus en la substance analysée.

II. — ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE DE FRAGMENTS DE XYLÈME DE TUBERCULES DE SCORSONÈRE CULTIVÉS *IN VITRO*

1. — MÉTABOLISME DES FRAGMENTS DE XYLÈME DE TUBERCULES DE SCORSONÈRE, LORS DE LA MISE EN CULTURE.

1° *L'influence des opérations d'isolement.*

L'isolement des fragments d'organes végétaux, en vue de leur culture, nécessite toute une série d'opérations : épluchage, lavage à l'eau courante et désinfection pendant une vingtaine de minutes par immersion dans une solution de $(\text{ClO})_2 \text{ Ca}$ à 9%. Les organes sont ensuite débarrassés de l'hypochlorite par plusieurs rinçages dans de l'eau stérilisée. Après ces traitements, les organes sont découpés en fragments de la taille désirée qui sont alors commencés sur les milieux. De telles manipulations altèrent les propriétés physiologiques des tissus. La désinfection et le rinçage provoquent la ramification et l'épaississement des mitochondries de tubercules d'Endive (BUVAT, 1946 a et b). L'augmentation de l'intensité respiratoire après la fragmentation des tubercules de Navet (BOUILLENNE et BOUILLENNE-WALRAND, 1926), de Carotte et de Topinambour (LACHAUX, 1944 a) a déjà été signalée.

J'ai mesuré les échanges gazeux respiratoires de tubercules de Scorsonère, avant et après épluchage, et après désinfection et lavage.

L'épluchage des tubercules provoque une élévation de l'intensité des échanges gazeux. L'intensité respiratoire passe de 31 à 56 mm³ de CO₂ émis par heure et par mg d'N protéique. L'augmentation de l'émission de CO₂ provient d'une dégradation plus rapide des chaînes carbonées (sans doute glucidiques). De plus les lésions s'accompagnent d'une oxydation des polyphénols qui se traduit par une augmentation plus importante de l'absorption d'oxygène (diminution du Q.R. de 1 à 0,9) et un assombrissement des organes au niveau des laticifères.

Au contraire, la désinfection par l'hypochlorite, qui provoque une dénaturation des enzymes superficiels, détermine une diminution de l'IR et le retour du QR au voisinage de l'unité.

2° *Les variations physiologiques pendant les premières 24 heures qui suivent l'ensemencement.*

Il est nécessaire de préciser la nature et l'amplitude des variations physiologiques provoquées par le contact avec le milieu nutritif. Il est utile également de repérer le début des manifestations de l'activité des substances de croissance ajoutées au milieu.

Trois lots de fragments sont préparés. Un premier lot est conservé tel quel dans une enceinte dont l'atmosphère est saturée d'eau. Un second lot est mis en contact du milieu sans substance de croissance. Le troisième est laissé en contact avec le milieu renfermant l'acide α -naphthalène-acétique à la concentration de 10^{-5} . Les mesures des échanges gazeux sont faites après 1 heure,

TABLEAU I

Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Durée de séjour	Conditions	IRNp (1)	QR	Teneur en N protéique (2)
Après 1 heure	Atmosphère humide	55	0,92	0,36
	Milieu sans ANA	55	0,95	0,37
	Milieu avec ANA 10^{-5}	56	0,94	0,37
Après 7 heures	Atmosphère humide	50	0,92	0,37
	Milieu sans ANA	83	1,02	0,38
	Milieu avec ANA 10^{-5}	85	1,01	0,38
Après 18 heures	Atmosphère humide	49	0,96	0,38
	Milieu sans ANA	91	1,02	0,40
	Milieu avec ANA 10^{-5}	89	1,04	0,41
Après 24 heures	Atmosphère humide	42	0,97	0,36
	Milieu sans ANA	129	1,05	0,42
	Milieu avec ANA 10^{-5}	114	1,04	0,40

Variations de l'intensité et du quotient respiratoires et de la teneur en N protéique de fragments venant d'être mis en contact avec un milieu de culture. Comparaison avec des fragments laissés simplement en atmosphère humide.

7 heures, 18 heures et 24 heures. Le tableau I donne les valeurs obtenues pour l'IRNp, le QR, ainsi que la teneur en N protéique.

L'examen de ce tableau révèle un accroissement des échanges gazeux après une heure. Cet accroissement est dû au découpage qui précède la mise en culture. L'IRNp est alors légèrement plus élevée qu'après la désinfection. La dernière fragmentation a provoqué des lésions suivies d'un abaissement du QR initial de 1.

L'IRNp des tissus mis en contact des milieux croît très rapidement. Elle triple en 24 heures. La substance de croissance ne semble pas exercer d'influence précoce. La mise en contact avec

(1) en mm^3 de CO_2 / heure / mg d'Np.

(2) en mg pour 100 mg de substance sèche.

le milieu est suivie d'une absorption importante de glucides. Les glucides absorbés sont en partie oxydés, d'où l'élévation de l'IRNp.

Le QR s'élève progressivement. Cette élévation peut être due aux synthèses protéiques qui nécessitent la réduction des nitrates. Cette réduction s'accompagne d'une oxydation des glucides sans absorption d'O₂. Les expériences qui suivent confirment cette protéogenèse précoce.

Si les traumatismes, dus à la fragmentation, modifient le métabolisme, l'effet de l'apport d'aliments respiratoires provenant du milieu est beaucoup plus important (LIORET, 1955). Ces résultats confirment les observations faites sur le même sujet par PLANTEFOL et GAUTHERET (1939) et LACHAUX (1944 b).

2. — MÉTABOLISME DE FRAGMENTS DE XYLÈME DE TUBERCULES DE SCORSONÈRE CULTIVÉS *in vitro*, EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES DE CROISSANCE.

A. Expériences.

Trois expériences sont réalisées :

1^o L'une a trait à l'influence de l'acide α -naphtalène-acétique (ANA) et porte sur 5 lots de tissus : un lot témoin et 4 lots cultivés respectivement en présence de 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ et 10⁻⁴ d'auxine.

2^o La seconde concerne l'influence du lait de Coco. Elle porte sur trois lots de tissus. Un lot témoin et deux lots cultivés en présence soit de 2%, soit de 10% de lait de Coco.

3^o La troisième est relative à l'influence de l'hydrazide maléique (HM). Elle porte sur trois lots de tissus : un lot témoin et deux lots cultivés en présence soit de 10⁻⁵, soit de 10⁻⁴ d'HM. Les glucides des tissus n'ont pas été dosés pour cette expérience.

Dans la suite de l'exposé, les abréviations suivantes sont attribuées à ces 11 lots de tissus : Témoin ANA, ANA 10⁻⁷, ANA 10⁻⁶, ANA 10⁻⁵, ANA 10⁻⁴, Témoin LdC, LdC 2%, LdC 10%, Témoin HM, HM 10⁻⁵ et HM 10⁻⁴.

Chaque lot comprend au moins 100 fragments mis en culture. Quarante-huit sont utilisés pour l'analyse des échanges gazeux et des groupes de substances azotées, 48 pour l'analyse des glucides.

Chaque fragment de tissu est ensemencé sur une quantité de milieu mettant à sa disposition 630 mg de glucose et 1,9 mg d'N nitrique (1).

(1) La présence de lait de Coco, à la concentration de 10%, fournit pour chaque fragment un supplément de 60 mg de glucides (GORIS, communication personnelle) et un supplément d'N légèrement inférieur à 1 mg. Ce dernier est principalement sous la forme de protéines (PRADERA, FERNANDEZ et CALDERIN, 1942).

Les différentes analyses sont faites sur des fragments prélevés après 1, 8, 15 et 22 jours de culture (1).

Chaque détermination des échanges gazeux correspond à la moyenne de trois déterminations portant chacune sur 4 fragments. Les valeurs indiquées dans les tableaux numériques, relatives au poids de substance fraîche, de substance sèche et aux quantités d'azote d'un fragment, représentent donc les moyennes obtenues à partir de 12 fragments (2).

Les quantités de glucose restant dans le milieu après trois semaines sont également mesurées.

B. — Résultats.

Les colonies tissulaires présentent rapidement des caractères morphologiques particuliers, selon la nature des substances utilisées.

La figure 1 illustre ces particularités, après 3 semaines de culture.

La partie supérieure de tous les fragments est nécrosée.

Les témoins présentent un cal bien visible indiquant une prolifération notable. Des bourgeons apparaissent au cours de la seconde semaine et des feuilles minces se développent pendant la 3^e. Si la culture se prolonge, le développement des feuilles peut devenir considérable. La mort survient après 1 mois.

Les fragments du lot ANA 10⁻⁷ ont des cals plus volumineux ; le bourgeonnement est également fréquent. La mort survient également après 1 mois.

Pour le lot ANA 10⁻⁶, les cals sont encore plus volumineux et présentent un aspect spongieux ; des racines issues des régions tissulaires extérieures au milieu se forment fréquemment. Les tissus meurent après 4 semaines.

Le volume des fragments du lot ANA 10⁻⁵ est encore plus important. La texture très spongieuse favorise la rétention d'une grande quantité d'eau. Aucune formation de bourgeons ou de racines n'est constatée. Pour ces tissus, la mort survient après trois semaines.

Les fragments du lot ANA 10⁻⁴ ne montrent aucune prolifération dans la partie immergée dans le milieu. La partie émergée se développe en un tissu plus ou moins dissocié et constitué de

(1) Après 3 semaines, certains tissus sont morts, d'autres sont très différenciés, d'autres enfin ont épuisé la quantité d'N disponible dans le milieu.

(2) HELLER(1953) a précisé, par analyse statistique sur des tissus de Carotte, que ce nombre est suffisant pour apprécier de façon significative des variations de poids de substance fraîche supérieures à 15 %.

petits nodules accolés. Les tissus meurent également après trois semaines.

Les fragments cultivés en présence de 2% de lait de Coco ont un aspect identique à celui observé pour les fragments du lot ANA 10^{-7} .

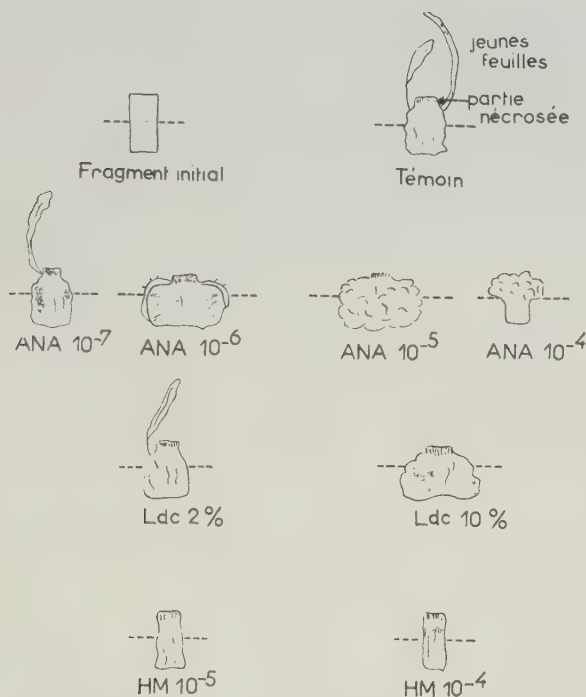


Fig. 1. — Aspect présenté par des fragments de xylème de tubercules de Scorsonère, après trois semaines de culture *in vitro*, en présence de différentes substances de croissance.
(----- niveau du milieu de culture).

Les fragments du lot LdC 10% présentent un cal très volumineux, compact, signe d'une prolifération intense ; les bourgeons n'apparaissent que très rarement. La mort de ces tissus ne se manifeste qu'après quatre semaines.

En présence de 10^{-5} d'HM, les cals sont peu développés. Les tissus ne bourgeonnent pas et ne forment pas de racines. Ils meurent pendant la troisième semaine.

Les cals ne sont pas visibles avec 10^{-4} d'HM. Les tissus meurent également après trois semaines.

Lorsque des bourgeons et des racines se développent, ils apparaissent au cours de la troisième semaine (très rarement avant). Les expériences ont été interrompues à ce moment, de sorte que le poids de ces organes ne dépasse jamais 2% du poids de la substance fraîche totale d'un fragment.

1° *Variations du poids des fragments et de leur teneur en eau.* (Tableau II).

a) *Variations du poids de substance fraîche.* L'augmentation du poids de matière fraîche est continue pour presque tous les lots de culture. Seul le lot 10^{-4} HM fait exception.

Le poids des témoins double à peu près au cours de l'expérience. L'accroissement est légèrement plus faible pour le témoin LdC et légèrement plus élevé pour le témoin HM.

La quantité de matière fraîche s'élève considérablement en présence d'ANA. Après trois semaines, le poids initial du lot ANA 10^{-7} est multiplié par 2,5 ; celui du lot ANA 10^{-6} par 4,5 ; celui du lot ANA 10^{-5} par 5 et enfin celui du lot ANA 10^{-4} seulement par 1,8.

Le lait de Coco provoque également un accroissement de la matière fraîche, le poids initial est presque triplé après trois semaines.

Pour le lot HM 10^{-5} , le poids initial n'est multiplié que par 1,6. L'augmentation est alors nettement inférieure à celle constatée pour les témoins. Le lot HM 10^{-4} ne s'accroît pas.

b) *Variations du poids de substance sèche.* L'accroissement du poids de substance sèche des témoins est également continu. Après trois semaines, il représente environ 35% du poids initial.

Pour les lots ANA 10^{-7} et ANA 10^{-6} , la quantité de matière sèche obtenue après trois semaines est peu différente de celle obtenue avec le témoin. En présence de 10^{-5} d'ANA, l'accroissement est beaucoup plus faible (11% du poids initial). Pour le lot ANA 10^{-4} , la substance sèche initiale a diminué de 40% après deux semaines.

La présence de 10% de lait de Coco entraîne une augmentation très importante du poids de la substance sèche (60% du poids initial), soit près de deux fois l'accroissement du témoin correspondant.

En présence de 10^{-5} d'HM, l'élévation de la quantité de matière sèche ne dépasse pas 20%. En présence de 10^{-4} d'HM, il n'y a pas de variation significative.

c) *Variations de la teneur en eau.* La teneur en eau des tissus est toujours plus élevée en fin d'expérience.

TABLEAU II

Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Jours	Poids de substance fraîche d'un fragment en mg.				Poids de substance sèche d'un fragment en mg.				Teneur en eau en mg d'eau pour 100 mg de substance sèche.			
	1	8	15	22	1	8	15	22	1	8	15	22
Témoin ANA	726	875	1330	1461	130	169	173	182	458	417	668	658
10 ⁻⁷	699	914	1333	1834	128	161	183	188	446	467	737	875
10 ⁻⁶	725	1239	1722	3161	132	133	158	183	449	831	989	1627
10 ⁻⁵	702	1533	2592	3475	124	136	142	139	466	1028	1725	2486
10 ⁻⁴	683	739	1103	1394	135	100	81	80	420	639	1261	1642
Témoin LdC	714	817	868	1182	130	141	142	170	449	479	511	595
2 ^o LdC	712	874	1150	1320	128	143	153	171	464	511	651	671
10 ^o LdC	702	1071	1785	1960	131	155	198	209	436	591	801	837
Témoin HM	706	925	1395	1614	149	176	191	209	373	425	630	703
10 ⁻⁵	728	813	1177	1213	153	158	166	169	376	413	609	676
10 ⁻⁴	711	751	769	750	146	159	144	137	386	372	433	447

Variations des poids de substance fraîche, de substance sèche et de la teneur en eau.

En présence des concentrations de 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} en ANA, les teneurs en eau deviennent extrêmement élevées.

En présence de lait de Coco, les tissus ont des teneurs en eau assez élevées, mais très inférieures à celles constatées pour les lots ANA.

En présence d'HM, les teneurs en eau s'élèvent très peu.

2° Variations des groupes de substances azotées. (Tableau III).

Les tissus de parenchyme vasculaire de tubercule de Scorsonère contiennent cinq fois plus d'N soluble que d'N protéique. Des analyses ultérieures montrent que l'N de l'asparagine représente 85% de cet N soluble.

Une certaine variabilité apparaît entre les tissus utilisés pour les différentes expériences. Les fragments pris pour l'expérience étudiant l'action de l'ANA ont des quantités d'N soluble et protéique supérieures aux teneurs des fragments utilisés pour les autres expériences. On peut observer cependant l'excellente homogénéité des différents lots d'une même expérience : les quantités d'N total des fragments ayant séjourné 24 heures sur les milieux sont pratiquement identiques.

Les résultats mettent en évidence les faits suivants :

a) La quantité d'N protéique augmente pour tous les lots de tissus. L'augmentation est de plus de 200% de la quantité initiale pour les témoins, elle est du même ordre de grandeur pour les lots ANA 10^{-7} , ANA 10^{-6} et ANA 10^{-5} (LIORET, 1953 a). Elle est très élevée pour les tissus cultivés en présence de lait de Coco : 289% pour le lot LdC 2%, 367% pour le lot LdC 10% (LIORET, 1955). L'élévation de la quantité de protéines n'est que de 75% pour les tissus cultivés en présence de 10^{-4} d'ANA et de 32% pour le lot HM 10^{-1} .

b) Les variations de l'N soluble sont beaucoup plus faibles. Elles sont pratiquement nulles pour les témoins et les tissus cultivés en présence de faibles concentrations d'ANA (10^{-7} , 10^{-6}). Les fortes concentrations d'ANA entraînent cependant des diminutions notables de l'N soluble : 45% de la quantité initiale avec 10^{-5} d'ANA, 64% avec 10^{-1} .

L'hydrazide maléique provoque une diminution plus faible (15%).

Seuls les fragments cultivés en présence de lait de Coco présentent un accroissement de la quantité d'N soluble (23% pour le lot LdC 2%, 38% pour le lot LdC 10%).

c) Les nitrates n'ont été décelés que dans les tissus du lot ANA 10^{-5} . Les quantités trouvées sont de 0,13 mg d'N nitrique

TABLEAU III

Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Jours	N total				N protéique				N soluble organique			
	1	8	15	22	1	8	15	22	1	8	15	22
Témoin ANA	3,46	4,38	4,50	4,70	0,54	1,27	1,86	1,77	2,92	3,11	2,64	2,93
10 ⁻⁷ ANA.....	3,41	4,09	4,75	4,67	0,54	1,22	1,88	1,88	2,87	2,89	2,92	1,79
10 ⁻⁶ ANA.....	3,48	4,12	4,45	4,44	0,50	1,18	1,73	2,01	2,97	2,94	2,72	2,43
10 ⁻⁵ ANA.....	3,32	4,12*	3,66*	3,45*	0,50	1,51	1,79	1,81	2,83	2,48	1,79	1,53
10 ⁻⁴ ANA.....	3,54	2,88	2,42	1,92	0,51	0,70	0,90	0,89	3,02	2,18	1,52	1,03
Témoin LdC	2,49	3,06	3,16	3,27	0,45	1,04	1,15	1,27	2,04	2,02	2,01	2,00
2% LdC	2,42	3,12	3,98	4,22	0,45	1,29	1,78	1,75	1,97	1,83	2,20	2,47
10% LdC ...	2,51	3,16	4,51	4,86	0,45	1,83	1,86	2,11	2,06	1,33	2,65	2,75
Témoin HM	3,01	4,02	4,12	4,13	0,54	1,25	1,73	1,77	2,47	2,77	2,39	2,36
10 ⁻³ HM	2,99	3,05	3,12	3,42	0,54	0,86	1,20	1,32	2,45	2,19	1,91	2,10
10 ⁻⁴ HM	3,00	3,01	2,99	2,98	0,54	0,72	0,71	0,71	2,46	2,29	2,28	2,27

Variations des quantités d'azote en mg d'N pour un fragment.
 * (L'N nitrique est inclus dans les valeurs marquées d'un astérisque).

par fragment après 8 jours, 0,07 mg après 15 jours et 0,10 mg après 22 jours. Ces nitrates peuvent avoir été réellement absorbés par les cellules. Mais, étant donnée la grande hydratation des tissus, il est possible qu'ils soient simplement dissous dans l'eau des espaces intercellulaires.

d) Si, dans la majeure partie des cultures, les fragments ont absorbé de l'N du milieu, on constate parfois une perte d'N total qui ne peut s'expliquer que par une excrétion des substances azotées dans le milieu. Ainsi les fragments du lot ANA 10^{-4} ont, après trois semaines, une quantité d'N total inférieure à la quantité initiale. De même, les fragments du lot ANA 10^{-5} contiennent moins d'N en fin d'expérience qu'après 8 jours de culture, la quantité finale restant cependant supérieure à la quantité initiale.

En présence d'hydrazide maléique, la quantité d'N total ne varie pas. Pour le lot LdC 10%, l'augmentation d'N total d'un fragment (2,3 mg) est supérieure à la quantité d'N nitrique disponible dans le milieu (1,9 mg). Cet excédent ne peut provenir que des acides aminés présents dans le lait de Coco.

3° Variations des glucides solubles. (Tableau IV.)

Les tissus utilisés sont particulièrement riches en glucides solubles qui représentent 50% du poids de substance sèche. Il s'agit essentiellement de glucofructosanes accompagnés de quantités moins importantes de saccharose et de réducteurs libres.

Les variations des quantités de glucides des tissus témoins sont faibles. Les glucofructosanes des fragments du lot témoin ANA augmentent pendant la première semaine, puis diminuent. Cette augmentation transitoire est beaucoup moins apparente pour les tissus du lot témoin LdC. Dans les deux cas, les teneurs finales en glucides solubles totaux sont inférieures aux teneurs initiales (40% du poids de substance sèche contre 50%).

Les concentrations moyennes en ANA (10^{-6} et 10^{-7}) influent peu sur les quantités de glucides des fragments. Avec les concentrations plus élevées (10^{-5} et 10^{-4}), on observe dès le huitième jour de fortes diminutions des glucofructosanes dont les quantités sont très faibles en fin d'expérience. En présence de 10^{-5} d'ANA, après 15 jours, le saccharose n'est plus décelable. Avec ces concentrations élevées, les glucides réducteurs libres s'accumulent légèrement (LIORET, 1953 a).

La présence de lait de Coco ne provoque que de faibles variations des différentes catégories de glucides. Pour le lot LdC 10%, la quantité finale de glucides totaux est inférieure à celle trouvée dans les témoins. La diminution porte principalement sur le saccharose. Comme l'accroissement du poids de substance sèche des

TABEAU IV
Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Substances étudiées.		ANA					LdC		
	Jours	Témoin	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	Témoin	2 %	10 %
Glucides totaux	0	69,2	—	—	—	—	61,6	—	—
	8	84,9	81,5	50,8	39,8	33,8	65,6	54,4	64,7
	15	81	81	55,8	39	23,2	60,5	56,9	65,8
	22	73,2	74,6	63,9	28	12,6	67,2	70,2	50,6
Glucofructosanes	0	46,6	—	—	—	—	41,5	—	—
	8	63,4	61,5	30,1	19,8	19,8	47,9	38,7	37,8
	15	61,5	48,3	—	11,6	9,8	42,9	40,2	45,9
	22	56,4	52,4	25,7	8	3	48,1	51,3	39,9
Saccharose	0	13,7	—	—	—	—	12,0	—	—
	8	12,3	12,3	13,2	7,9	3,2	10,4	7,9	16,3
	15	12,3	21,4	—	7,3	0	9,3	6,7	6,7
	22	9,8	13	13,9	7,6	0	11,7	7,3	0
Glucides réducteurs libres	0	8,9	—	—	—	—	8,1	—	—
	8	9,2	7,7	7,5	12,1	12,8	7,3	7,8	10,6
	15	7,7	11,4	19,0	20,1	13,4	9,3	10	9,6
	22	7,1	8,5	24,3	12,4	9,6	7,4	11,6	10,7

Variations des quantités de glucides solubles en mg de glucose pour un fragment.

fragments cultivés en présence de lait de Coco est important, les teneurs finales en glucides totaux sont faibles (24% du poids de substance sèche).

4° *Utilisation des glucides du milieu.*

L'analyse des quantités de glucose présent dans les milieux en fin d'expérience montre que :

a) l'absorption de glucose est exaltée par l'ANA aux concentrations de 10^{-6} et 10^{-5} (123 mg de glucose absorbé par fragment en trois semaines pour le lot témoin ANA contre 160 mg pour les lots ANA 10^{-6} et ANA 10^{-5}) et par le lait de Coco (88 mg par fragment pour le lot témoin contre respectivement 145 et 195 mg pour les lots LdC 2% et LdC 10%);

b) l'absorption est ralentie par l'hydrazide maléique (142 mg de glucose absorbé pour le lot témoin contre 82 pour le lot HM 10^{-5} et 25 pour le lot HM 10^{-4});

c) aucune absorption ne se manifeste en présence de 10^{-4} d'ANA.

5° *Variations de l'intensité des échanges gazeux respiratoires.* (Tableau V).

Les échanges gazeux respiratoires des tissus présentent une variabilité beaucoup plus élevée que celle des autres caractéristiques physiologiques telles que les teneurs en substances azotées ou en glucides.

Cette variabilité est particulièrement grande pour les tissus n'ayant séjourné que 24 heures en présence des milieux. Des écarts dans l'émission horaire de CO_2 , par rapport à la valeur moyenne, de 25 mm³ par fragment, de 120 mm³ par g de substance sèche et de 30 mm³ par mg d'N protéique, sont difficilement interprétables. Après 8 jours de culture, cette variabilité est atténuée, les écarts non significatifs ne dépassent pas environ 10 mm³ par fragment, 50 mm³ par g de substance sèche et 10 mm³ par mg d'N protéique.

a) *Intensité respiratoire par colonie tissulaire* (IRc). Malgré l'accroissement de poids et en particulier des protéines des lots témoins, l'IRc de ces tissus augmente peu pendant la première semaine, reste constante pendant la deuxième et diminue pendant la troisième.

La présence d'ANA, aux concentrations de 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} , provoque une nette augmentation des échanges gazeux. L'IRc maximum est obtenue avec 10^{-5} . En présence de 10^{-4} d'ANA, l'IRc est voisine de celle observée pour le témoin (LIORET, 1953 b).

TABLEAU V
Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Jours	IRc (1)				IRs (2)				IRNp (3)			
	1	8	15	22	1	8	15	22	1	8	15	22
Témoin ANA	80	98	90	67	618	580	517	367	147	76	43	38
10 ⁻¹ ANA.....	65	124	126	121	505	773	690	646	126	102	71	64
10 ⁻⁶ ANA.....	52	125	135	143	394	938	865	778	104	105	79	71
10 ⁻⁵ ANA.....	51	192	172	139	401	1411	1214	1004	100	117	96	77
10 ⁻⁴ ANA.....	65	96	90	81	480	960	1109	1011	122	119	100	92
Témoin LdC	83	73	71	69	626	520	507	401	175	63	61	53
2% LdC.....	57	89	107	106	501	868	786	657	128	68	60	61
10% LdC....	66	134	155	137	444	659	796	620	144	73	84	65
Témoin HM	94	107	119	99	633	615	604	493	175	87	67	56
10 ⁻⁵ HM.....	97	98	101	88	628	646	610	532	180	119	85	69
10 ⁻⁴ HM.....	97	94	48	26	675	587	327	191	179	130	67	32

Variations de l'intensité respiratoire :

- 1) en mm³ de CO₂ émis/heure/fragment ;
- 2) en mm³ de CO₂ émis par g de substance sèche ;
- 3) en mm³ de CO₂ émis par mg d'N protéique.

Le lait de Coco provoque également une élévation de l'IRc, très sensible pour le lot LdC 10% (LIORET, 1955).

Au contraire, l'addition d'HM entraîne une diminution de l'IRc, principalement en fin d'expérience. On obtient ainsi une valeur très faible avec 10^{-4} d'HM après trois semaines.

Selon les différents lots, les maximums de l'IRc sont observés à des époques variées de la culture : maximum au huitième jour avec 10^{-5} et 10^{-4} d'ANA, au quinzième avec 2% et 10% de lait de Coco, au vingt-deuxième jour avec 10^{-6} d'ANA. Ces différences seront interprétées plus loin.

b) *Intensité respiratoire par gramme de substance sèche (IRs)*. Pour tous les témoins, l'IRs est maximum dès le premier jour et elle décroît constamment au cours de l'expérience.

Avec l'ANA, les phénomènes sont différents : l'IRs s'élève jusqu'au huitième jour, puis diminue lentement, les valeurs obtenues restant supérieures aux valeurs trouvées pour le témoin. L'IRs maximum est obtenue avec le lot ANA 10^{-5} .

En présence de lait de Coco, l'IRs est augmentée mais de façon moins sensible. Le maximum doit se situer entre le huitième et le quinzième jour.

La concentration 10^{-4} d'HM ne modifie pas l'IRs par rapport à celle du témoin, mais la concentration de 10^{-5} provoque, à partir de la seconde semaine, une forte diminution de cette intensité.

c) *Intensité respiratoire par mg d'N protéique (IRNp)*. L'IRNp évolue d'une façon analogue pour presque tous les lots de tissus.

Très élevée le premier jour, elle subit une diminution rapide au cours de la première semaine, puis plus lente jusqu'en fin d'expérience.

Seule la présence de doses élevées d'ANA ralentit la diminution de l'IRNp.

6° *Variations des quotients respiratoires (QR)*.

Les quotients respiratoires sont tous très voisins de l'unité. Les oxydations respiratoires portent donc principalement sur les glucides. Cependant, au cours de la première semaine, les QR sont très légèrement supérieurs à 1 (ils oscillent entre 1,02 et 1,09) ; leurs valeurs doivent être alors en liaison avec les synthèses protéiques. Après 15 jours, les écarts avec l'unité sont insignifiants.

C. — *Interprétations et discussions.*

1° *La croissance des tissus.*

A dessein, le terme de « croissance » n'a pas été employé jusqu'à présent. Il prête en effet à ambigüité.

TAMIYA (1935) a défini la croissance comme « la formation de

parties nouvelles dans des organismes ». Cette excellente définition théorique n'est malheureusement pas toujours utilisable sur le plan quantitatif. Aussi est-il nécessaire de choisir un critère approprié pour donner une valeur numérique à cette formation de parties nouvelles.

Ce critère peut varier selon les organismes : accroissement du poids de la substance fraîche ou du poids de la substance sèche pour les êtres vivants les plus divers, augmentation de l'opacité des suspensions ou du volume recueilli après centrifugation pour nombre de microorganismes, etc...

L'accroissement du poids de substance fraîche est très souvent choisi pour exprimer la croissance des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Les accroissements de poids de substance sèche, de l'N total, de l'N protéique, des acides nucléiques sont également utilisés (voir WHITE, 1943, et les différentes communications du Colloque de Briançon, 1954) (1). Ces divers tests se réfèrent chacun à un aspect différent de la croissance. Chacun ne l'exprime que partiellement. Leur augmentation peut résulter de l'accroissement de constituants cellulaires différents : protoplasme, réserves protidiques, glucidiques, substances membranaires, eau, dont les variations quantitatives ne sont pas nécessairement concordantes.

Les résultats précédents permettent d'illustrer cette question.

Considérons :

- a) l'accroissement du poids de substance fraîche ;
- b) les variations du poids de substance sèche ;
- c) l'accroissement de la quantité d'eau ;
- d) l'accroissement de la masse protoplasmique, calculé d'après la quantité de protéines formées (Δ protéines = ΔN protéique $\times$ 6,25, selon CHIBNALL, 1939) ;
- e) les variations du poids des substances que l'on peut considérer, en première approximation, comme inertes (glucides solubles, substances azotées de réserve telles que l'asparagine, substances membranaires) dont la masse totale est obtenue par différence entre le poids de substance sèche et la quantité de protéines.

Tous les lots étudiés présentent un accroissement de poids de substance fraîche et de la quantité de protéines. Tous manifestent donc des phénomènes de croissance.

Le classement des lots d'après leurs gains de poids et de protéines, par ordre décroissant, est le suivant :

(1) Voir page 17.

<i>Substance fraîche</i>	<i>substance sèche</i>	<i>Protéines</i>
ANA 10^{-5} : + 2.763 mg	LdC 10 % : + 78 mg	LdC 10 % : + 10,3 mg
ANA 10^{-6} : + 2.436 mg	Témoin ANA : + 53 mg	ANA 10^{-6} : + 9,4 mg
LdC 10 % : + 1.258 mg	ANA 10^{-6} : + 51 mg	ANA 10^{-5} : + 8,2 mg
Témoin ANA : + 735 mg	ANA 10^{-5} : + 14 mg	Témoin ANA : + 7,6 mg
ANA 10^{-4} : + 711 mg	HM 10^{-4} : — 9 mg	ANA 10^{-4} : + 2,3 mg
HM 10^{-4} : + 43 mg	ANA 10^{-4} : — 55 mg	HM 10^{-4} : + 1,1 mg

Les classements sont différents. Si des similitudes se manifestent, par exemple pour l'effet favorable du lait de Coco sur l'augmentation du poids de substance sèche et de la quantité de protéines, on peut souligner également la grande différence de classement présentée par le lot ANA 10^{-5} pour les 3 tests.

STRAUSS et LARUE (1954) ont constaté des faits comparables, en étudiant la nutrition carbonée d'endospermes de Maïs cultivés *in vitro*. Ils ont montré que la concentration du milieu en saccharose la plus favorable à la croissance des tissus est de 2% pour l'augmentation du poids de substance fraîche et de 8% pour l'augmentation du poids de substance sèche. Les deux critères de croissance sont différemment sensibles aux variations de la composition du milieu. L'emploi d'un unique critère est donc insuffisant. Les différents constituants cellulaires ne varient pas nécessairement dans une même proportion, selon les conditions de culture.

On observe ainsi les similitudes et les différences suivantes :

1° L'accroissement peut porter en même temps sur le poids de substance fraîche, le poids de substances inertes et la quantité de protéines, sans modification profonde des rapports entre ces quantités. Il en est ainsi pour les tissus témoins et les tissus cultivés en présence de lait de Coco.

2° Une très forte augmentation de la teneur en eau peut entraîner une élévation considérable du poids de substance fraîche, sans qu'il en soit de même pour le poids de substance sèche. Il en est ainsi pour les tissus cultivés en présence de 10^{-6} d'ANA.

3° L'accroissement du poids de substance fraîche et des protéines peut avoir lieu alors que le poids des matières inertes reste constant; il en résulte un faible accroissement du poids de substance sèche. Cette forme de croissance s'accompagne d'une très forte teneur en eau. Il en est ainsi pour les tissus cultivés en présence de 10^{-5} d'ANA. A ce propos, GAUTHERET (1955) a montré que les tissus de Vigne-Vierge, cultivés sur un milieu renfermant aussi 10^{-5} d'ANA, se développent en colonies formées de cellules de grande taille, en partie dissociées.

4° L'accroissement de poids de substance fraîche et de la quantité de protéines peut s'accompagner d'une forte diminution du poids de substance sèche due à l'épuisement des substances

de réserve. Il en est ainsi pour les tissus cultivés en présence de 10^{-4} d'ANA.

5° On peut enfin constater des variations du poids de substance fraîche et de substance sèche, non significatives, accompagnées d'une élévation faible, mais parfaitement significative, de la quantité de protéines. Il en est ainsi pour les tissus cultivés en présence de 10^{-4} d'HM. Le contact avec le milieu a probablement provoqué le déclenchement des phénomènes de croissance qui ont été ensuite rapidement bloqués par l'inhibiteur.

Ces exemples montrent que le choix d'un seul critère de croissance conduit à comparer des faits de nature différente. Un choix unique est donc à éviter surtout lorsqu'il s'agit de comparer l'influence de conditions de culture différentes. Dans ce cas, il est nécessaire de préciser la nature exacte des accroissements constatés par l'analyse des diverses caractéristiques physiologiques (1).

2° *Les variations de l'intensité respiratoire.*

Les divers modes d'expression de l'intensité respiratoire fournissent des indications différentes dont la signification doit être précisée.

L'intensité respiratoire, rapportée à un organe, un fragment, une culture (IRc), n'exprime que des échanges gazeux globaux, sans tenir compte des variations quantitatives et qualitatives de la matière végétale qui le constitue.

Si l'intensité respiratoire est exprimée par unité de substance fraîche ou par unité de substance sèche, elle ne tient pas compte des variations relatives dans la composition de la matière végétale. Les proportions entre l'eau, les matières inertes et le protoplasme ne sont pas constantes. Avec ce mode d'expression, l'intensité est d'autant plus faible que la proportion de matières inertes est plus élevée (GARREAU, 1851 — KIDD, WEST et BRIGGS, 1921 — GOODWIN et GODDARD, 1940 — SMITH, F. G., 1948 — etc...).

L'intensité respiratoire exprimée par unité de protéines (IRNp) doit permettre justement de préciser l'activité du protoplasme (2). Elle est la plus utile dans l'interprétation des échanges gazeux globaux représentés par l'IRc.

IRc, IRNp et les quantités d'N protéique (Np) sont liées entre elles par la relation :

$$\text{IRc} = \text{IRNp} \times \text{Np}$$

Dans les lots de tissus les plus caractéristiques, les possibi-

(1) LANCE (1957), est arrivé indépendamment, à des conclusions identiques.

(2) Le terme d'activité, pris ici dans une acception large, est défini par la quantité de substrat respiratoire dégradé en un temps donné pour une unité de masse protoplasmique.

lités de variation de cette relation en fonction de ses termes, sont les suivantes :

1° *Np* reste constant : la quantité de protoplasme ne varie pas.

a) *IRc* augmente. D'après la relation précédente, *IRNp* augmente. L'augmentation des échanges gazeux est due à une plus grande activité du protoplasme. Il en est ainsi pour tous les tissus, pendant les premières 24 heures de culture.

b) *IRc* diminue. Il en est de même pour l'*IRNp*. La diminution des échanges gazeux est due à une plus faible activité du protoplasme. Il en est ainsi pour les tissus du lot HM 10^{-4} pendant la deuxième semaine, pour les lots témoins, ANA 10^{-5} , ANA 10^{-4} et HM 10^{-4} pendant la troisième semaine.

2° *Np* augmente : la quantité de protoplasme augmente.

a) *IRc* augmente. Trois cas peuvent alors se présenter :

i) *IRNp* augmente. L'accroissement des échanges gazeux est dû à la fois à l'augmentation de la quantité de protoplasme et à l'élévation de son activité. Il en est ainsi pour le lot ANA 10^{-5} entre le premier et le huitième jour.

ii) *IRNp* est constante. L'accroissement des échanges gazeux n'est dû qu'à l'augmentation de la quantité de protoplasme dont l'activité ne varie pas. Il en est ainsi pour le lot ANA 10^{-4} entre le premier et le huitième jour et le lot LdC 10% pendant la seconde semaine.

iii) *IRNp* diminue. L'accroissement des échanges gazeux est dû à une augmentation de la quantité de protoplasme. Cette augmentation est suffisamment importante pour masquer la diminution de l'activité du protoplasme. Il en est ainsi pour les lots témoins, ANA 10^{-6} , LdC 10%, entre le premier et le huitième jour et pour le lot ANA 10^{-6} pendant la troisième semaine.

b) *IRc* est constante. *IRNp* ne peut que diminuer. L'augmentation de la quantité de protoplasme est compensée par la diminution de son activité et les échanges gazeux ne varient pas. Il en est ainsi pour les lots HM 10^{-1} entre le premier et le huitième jour, pour les témoins et ANA 10^{-6} pendant la deuxième semaine.

c) *IRc* diminue. *IRNp* ne peut également que diminuer. La diminution de l'activité du protoplasme l'emporte sur l'augmentation de sa quantité. Les échanges gazeux diminuent.

Dans les trois derniers cas étudiés, on peut constater à la fois une augmentation de la quantité de protéines et une diminution de l'activité du protoplasme. Les phénomènes sont particulièrement sensibles pour la plupart des lots pendant la première semaine et s'expliquent de la manière suivante. Les protéines totales des tissus peuvent être subdivisées en deux fractions :

1^o les « protéines respiratoires » qui comprennent essentiellement les enzymes respiratoires proprement dits : déshydrogénases, oxydases, carboxylases, et les enzymes (hydrolases, kinases) qui assurent l'apport de substrat correspondant à l'activité maximum des premières.

2^o les « protéines non respiratoires » qui comprennent essentiellement les autres protéines douées ou non d'activité enzymatique. Lors de la protéogénèse, le rapport quantitatif entre les protéines « respiratoires » et les protéines « non respiratoires » peut diminuer, la synthèse des premières se faisant moins rapidement que la synthèse des secondes. Il en résulte une diminution de l'activité du protoplasme.

L'évolution des échanges gazeux respiratoires des tissus mis en culture peut se résumer ainsi :

La mise en culture des fragments provoque une forte élévation des échanges, due à une augmentation de l'activité du protoplasme.

L'IRc des tissus témoins, pendant la première semaine, augmente légèrement. L'augmentation est due à l'accroissement du protoplasme. Puisque l'IRNp diminue, les protéines néoformées doivent contenir moins de protéines respiratoires et l'activité du protoplasme diminue. Pendant la seconde semaine, Np augmente légèrement, IRNp diminue et IRc varie peu. Pendant la troisième semaine, Np est constant, la diminution de l'IRNp se poursuit, et il en résulte une diminution de l'IRc.

En présence d'ANA, la chute de l'activité respiratoire du protoplasme est d'autant moins prononcée que la concentration en ANA est plus élevée. Or, sauf pour la concentration de 10^{-4} , la protéogénèse est du même ordre de grandeur que pour le témoin. La vitesse de la synthèse des protéines respiratoires doit être plus rapide. Les valeurs des échanges gazeux des tissus cultivés en présence d'ANA sont alors beaucoup plus élevées que pour les témoins. Avec les fortes concentrations 10^{-5} et 10^{-4} , les teneurs des tissus en matières inertes sont faibles, et les valeurs de l'intensité respiratoire exprimée par g de substance sèche sont alors très élevées.

En présence de lait de Coco, la protéogénèse est intense. Les fortes augmentations des échanges gazeux respiratoires des fragments cultivés sur lait de Coco sont dues à l'augmentation de la quantité de protoplasme, dont l'activité évolue d'une façon analogue à celle du témoin.

En présence de 10^{-4} d'hydrazide maléique, la protéogénèse est peu importante. Elle cesse complètement après une semaine. L'augmentation de la quantité de protoplasme est minime. De plus, l'activité protoplasmique est très fortement diminuée. En

fin d'expérience, les échanges respiratoires sont extrêmement faibles.

3° *L'utilisation des glucides.*

a) *Evaluation des différents modes d'utilisation des glucides.* Les glucides solubles présents dans les tissus représentent la réserve mobile des chaînes carbonées. Cette réserve s'enrichit du glucose du milieu absorbé par les tissus. Elle pourvoit également aux besoins matériels et énergétiques et de ce fait s'appauvrit. Les quantités de glucides mesurés résultent donc du bilan entre leur absorption et leur utilisation.

On peut, dans une première approximation, distinguer trois destinées possibles pour les atomes de carbone des glucides et déterminer leur ordre de grandeur.

1° Emission respiratoire de CO_2 .

2° Transformation en composés azotés organiques.

3° Transformation en composés inertes autres que les glucides solubles (principalement en substances membranaires).

i) *Glucose correspondant au CO_2 émis.*

La mesure de l'intensité respiratoire d'échantillons prélevés à différentes périodes, permet de calculer approximativement la quantité totale de CO_2 émis. On admettra que l'intensité respiratoire moyenne d'un fragment, au cours d'une période comprise entre deux mesures, est donnée par la moyenne arithmétique des intensités mesurées au début et à la fin. De telles moyennes ont été calculées pour les périodes suivantes : 0-1 jour, 8-15 jours, 15-22 jours. Multipliées par le nombre d'heures écoulées entre les deux dates extrêmes, elles fournissent les quantités de CO_2 émis pendant les périodes considérées. Les quantités de glucose disparu en sont déduites.

A 1 cm₃ de CO_2 correspond $\frac{12 \times 180}{22,4 \times 72} = 1,3$ mg de glucose.

ii) *Glucose correspondant aux substances azotées synthétisées.*

Les quantités de protéines sont calculées comme précédemment en multipliant par le facteur 6,25 les poids d'N protéique. Puisque le poids de carbone protéique représente environ 50% du poids des protéines (VICKERY et PUCHER, 1939), à 1 mg d'N protéique

correspond : $\frac{6,25 \times 180}{2 \times 72} = 7,81$ mg de glucose.

Le poids de substances azotées solubles est obtenu en multipliant le poids d'N soluble organique par 5. Ce coefficient moyen correspond à un mélange d'acides aminés et d'amides contenant une forte proportion d'asparagine. Le carbone de ces substances

représente 40% de leur poids. A 1 mg d'N soluble organique correspond alors : $\frac{5 \times 2 \times 180}{5 \times 72} = 5$ mg de glucose.

Puisque les variations de substances azotées solubles sont faibles et n'affectent que des quantités de carbone peu importantes, on peut admettre que les erreurs introduites par le mode de calcul sont acceptables.

iii) *Glucose correspondant aux composés inertes.*

En calculant la différence :

PS — (Gs + SN) dans laquelle

PS = poids de substance sèche

Gs = poids des glucides solubles (1)

SN = poids total des substances azotées

on obtient une valeur représentative des quantités de substances inertes différentes des glucides et des substances azotées solubles. Il s'agit principalement des composés membranaires et aussi des sels minéraux et des diverses substances composant le latex.

Tous ces produits n'ayant pas été dosés, il n'est pas possible d'établir avec rigueur, à leur sujet, un coefficient de conversion en glucose. Pour les glucides membranaires, les coefficients de transformation sont légèrement supérieurs à 1 (1,1 pour la cellulose). Il faut également déduire les substances minérales (2), ce qui entraîne une diminution de la valeur du coefficient. Pour simplifier les calculs, le coefficient adopté ici est l'unité. On estime ainsi que l'augmentation du poids des substances inertes représente approximativement le poids de glucose nécessaire à la synthèse de ces composés.

b) *Bilan de l'utilisation du glucose.* Les résultats des calculs effectués figurent dans les 4 premières colonnes du tableau VI.

Dans la colonne 5 sont indiquées les variations des quantités de glucides solubles (3).

(1) D'après les données du tableau 4 corrigées de la perte d'eau due à la condensation des oses en polyholosides. Pour le saccharose, cette correction est exactement déterminée. Pour les glucosylfructosanes, il a été admis que la condensation se faisait avec une perte de 10% du poids des hexoses.

(2) D'après KANDLER (1955) et GORIS (communication personnelle), les cendres de divers tissus cultivés *in vitro*, représentent 2 à 3% du poids de substance sèche.

(3) Le dosage des glucides solubles n'a pas été fait dans l'expérience utilisant l'hydrazide maléique. Pour les tissus de cette expérience, la différence suivante a été calculée :

« gluc. disparu du milieu — (gluc. dégradé en CO_2 + gluc. converti en substances azotées) ». Les valeurs obtenues correspondent aux quantités de glucose transformées en matières inertes, glucides solubles compris. Elles sont indiquées dans les colonnes 4 et 5.

TABLEAU VI
Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

	1	Glucose correspondant.				5	6	7	8
		aux CO ₂ émis	aux Protéines	aux Substances azotées solubles	aux Autres substances carbonées				
Témoin ANA	58			0	50	3	118	121	123
10 ⁻⁷ ANA	75		10	0	45	5	131	136	151
10 ⁻⁶ ANA	79		11	—	43	3	132	129	160
10 ⁻⁵ ANA	101		12	—	43	—	156	120	163
10 ⁻⁴ ANA	58		10	—	51	36	56	4	0
			3	—	4	52			
Témoin LdC	50		7	—	29	7	86	79	88
2% LdC	62		10	—	26	6	100	116	145
10% LdC	86		13	3	76	15	178	165	195
Témoin HM	72		10	0		60			142
10 ⁻⁵ HM	64		6	1		13			82
10 ⁻⁴ HM	45		1	1		20			25

Bilan de l'utilisation du glucose (en mg) après trois semaines de culture *in vitro*.

Dans la colonne 6, on trouve la somme des valeurs groupées dans les colonnes 1, 2, 3 et 4. Cette somme correspond aux quantités totales de glucose utilisé, soit dans les synthèses de nouvelles substances carbonées, soit dans les dégradations. Les quantités de glucose utilisé, corrigées des variations de glucides solubles des tissus, doivent correspondre aux quantités de glucose prélevé dans le milieu. Les valeurs obtenues après correction se trouvent dans la colonne 7. Enfin, la colonne 8 du tableau 6 donne les valeurs correspondantes, mesurées après l'analyse des milieux.

L'examen du tableau VI conduit aux remarques suivantes. Dans 7 cas sur 9, il existe une correspondance satisfaisante entre les valeurs calculées et les valeurs mesurées à propos du glucose prélevé dans le milieu. Il existe aussi une bonne similitude entre les variations de ces deux séries de valeurs. Les calculs faits pour les lots ANA 10^{-6} et ANA 10^{-5} montrent un déficit important des résultats des calculs par rapport aux mesures. La différence est de 35% des quantités mesurées.

Pour les tissus témoins, l'absorption de glucose externe équilibre l'utilisation des glucides des tissus dans les synthèses et les dégradations. La quantité totale des glucides présents dans un fragment varie peu. Comme le poids de substance sèche augmente, la teneur en glucides diminue. Environ la moitié des glucides utilisés est dégradée et retrouvée sous forme de CO_2 .

La présence d'ANA dans le milieu stimule à la fois l'utilisation et l'absorption des glucides métabolisables. A la concentration de 10^{-5} , l'utilisation l'emporte sur l'absorption et il en résulte une diminution importante des réserves glucidiques des tissus. Les dégradations sont très importantes et, avec 10^{-5} d'ANA, le CO_2 émis correspond à 70% des glucides utilisés.

En présence de 10^{-4} d'ANA, l'absorption est nulle. Tout le glucose interne utilisé est oxydé. La présence d'auxine accélère l'utilisation des glucides dont les tissus peuvent disposer. Ce fait confirme les résultats obtenus par GORIS (1947-1948, a et b) qui a montré l'effet stimulant de l'acide indolacétique sur l'utilisation des glucides internes des tissus de Carotte ou de Topinambour cultivés en absence de glucose.

La vitesse d'utilisation n'est cependant pas toujours plus grande que la vitesse d'absorption. Pour les tissus de Carotte, la présence d'auxines dans les milieux provoque une augmentation de la teneur en glucides (WIGGANS, 1954 — GORIS, 1954). La vitesse d'absorption est alors plus élevée que la vitesse d'utilisation.

Le fait le plus général est donc la stimulation de l'utilisation des glucides.

La présence de lait de Coco exalte simultanément l'absorption et l'utilisation des glucides. On obtient les valeurs maximums

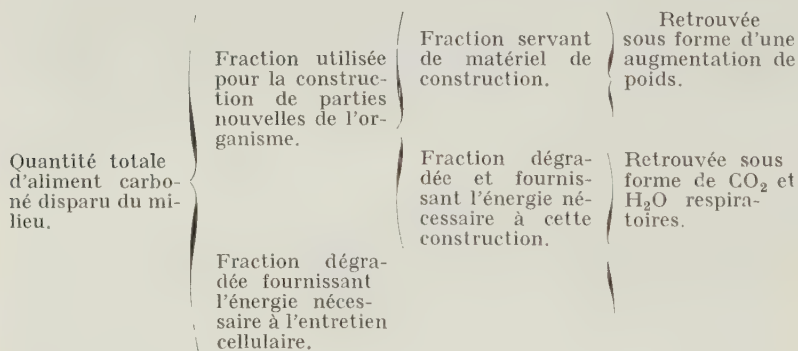
pour les deux phénomènes avec le lot LdC 10%, l'absorption l'emportant alors légèrement sur l'utilisation. Les résultats obtenus par GORIS et DUHAMET (1958), avec des fragments de tubercules de Topinambour, sont semblables. Les tissus de Scorsonère et de Topinambour se comportent donc d'une manière différente des tissus de Carotte pour lesquels le lait de Coco provoque la disparition des glucides réducteurs libres (GORIS, 1950).

La présence d'hydrazide maléique ralentit à la fois l'absorption et l'utilisation des glucides.

4° *L'utilisation de l'énergie libérée par les oxydations respiratoires.*

Les organismes hétérotrophes utilisent les aliments organiques mis à leur disposition pour leur *croissance* (formation de parties nouvelles) et pour leur *entretien* (maintien de l'intégrité de parties préexistantes) (TERROINE et WURMSER, 1922).

TAMIYA (1935) a résumé l'utilisation des aliments carbonés de la façon suivante :



D'après ce schéma, la respiration totale de l'organisme comprend la somme de la respiration de croissance et de la respiration d'entretien.

L'entretien lui-même implique la formation de molécules nouvelles. Même si la masse protoplasmique n'accuse pas de variation, une partie des molécules qui la constituent sont continuellement dégradées et remplacées. Ces remaniements ont été démontrés lors de l'assimilation d'aliments marqués par des atomes lourds ou radioactifs, réalisée par des organes dont la croissance est très faible ou nulle : intégration de l'azote d'¹⁵NH₄Cl, en excédent par rapport à l'accroissement protéique, dans les protéines de plants de Tabac et de Sarrasin (VICKERY, PUCHER, SCHOENHEIMER et RITTENBERG, 1940); assimilation de glutamine marquée

par ^{14}C par des tissus de Carotte dont la croissance est très faible (STEWART, BIDWELL et YEMM, 1956); assimilation de $^{14}\text{CO}_2$ dans les protéines des feuilles de *Bryophyllum* maintenues à l'obscurité, en protéolyse dominante (CHAMPIGNY, 1956).

On peut conserver le schéma de TAMIYA en ajoutant que l'entretien nécessite quelques synthèses qui compensent les dégradations continues des éléments du protoplasme. Les oxydations respiratoires couvrent les dépenses énergétiques de toutes les synthèses, qu'elles correspondent à la croissance ou à l'entretien.

a) *Calculs de la respiration d'entretien et de la respiration de croissance.*

Les calculs suivants cherchent à exprimer un ordre de grandeur de la *respiration d'entretien* et de la *respiration de croissance*. Ils s'appuient sur un certain nombre d'hypothèses.

TERROINE et WURMSER (1922), TAMIYA (1935), ont pris l'augmentation du poids de substance sèche comme test de croissance. Or on a vu précédemment que des accroissements de protoplasme, caractérisés par l'élévation de la teneur en N protéique des tissus, peuvent avoir lieu alors que le poids de substance sèche reste constant ou même diminue.

Les raisonnements présentés ici tentent de suivre de plus près la croissance protoplasmique, aussi tiennent-ils compte essentiellement des quantités d'N protéique.

L'énergie respiratoire est calculée d'après le nombre de molécules de glucides consommées, qu'il s'agisse du glucose du milieu de culture ou de glucides tissulaires. Comme le QR est toujours très voisin de 1, il est admis qu'à l'émission d'une molécule de CO_2 correspond l'énergie libérée par l'oxydation complète d'un sixième de molécule de glucose.

L'étude de l'utilisation de l'énergie respiratoire nécessite la détermination des deux grandeurs suivantes :

1° La quantité de CO_2 émis correspondant à l'énergie d'entretien. Cette quantité est calculée pour une masse de tissus contenant 1 mg d'N protéique et pour une période donnée, on l'appellera *coefficient respiratoire d'entretien*.

2° La quantité de CO_2 correspondant à l'énergie de croissance. Cette quantité est calculée pour la synthèse d'une masse de tissus contenant 1 mg d'N protéique, on l'appellera *coefficient respiratoire de croissance*.

TAMIYA a admis que la valeur de la respiration d'entretien diminue avec l'âge des tissus. Néanmoins, afin de faciliter les calculs, il est supposé ici que le coefficient d'entretien est constant pendant la durée des expériences.

Pour déterminer la valeur du *coefficient respiratoire d'entre-*

lien, il est nécessaire de connaître la valeur des échanges gazeux des tissus ne s'accroissant pas. Les tissus simplement laissés en atmosphère humide, sans contact avec les milieux de culture répondent sensiblement à cette exigence. Les valeurs obtenues pour leur intensité respiratoire par mg d'N protéique (IRNp) qui figurent page 25, s'échelonnent de 39 à 55 mm³ de CO₂ émis par heure, soit 0,936 cm³ à 1,32 cm³ par jour. Afin de simplifier les calculs, le coefficient respiratoire d'entretien retenu est de

1 cm³ de CO₂ émis par jour et par mg d'N protéique.

TABLEAU VII

Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Périodes	RT				RE			
	0-8 j	8-15 j	15-22 j	0-22 j	0-8 j	8-15 j	15-22 j	0-22 j
Témoin ANA	16,2	15,6	12,6	44,4	7,4	10,9	11,7	30
10 ⁻⁷ ANA	16,2	21	20,7	57,9	7,1	10,7	13	30,8
10 ⁻⁶ ANA	15,7	21,8	23,3	60,8	6,7	10,2	13,1	30
10 ⁻⁵ ANA	21,2	30,6	26	77,8	8,1	11,6	12,6	32,3
10 ⁻⁴ ANA	14,4	15,6	14,3	44,3	4,8	5,6	6,3	16,7
Témoin LdC	13,3	12,1	11,8	37,2	5,9	8	9	22,9
2% LdC	14	16,4	17,8	48,2	6,5	10,1	13,4	30
10% LdC	17,8	24	24,5	66,3	9,1	12,8	13,9	35,8
Témoin HM	18,2	19	18,3	55,5	7,2	10,3	12,1	29,6
10 ⁻⁵ HM.....	17	16,6	15,8	49,4	5,6	7,2	8,8	21,6
10 ⁻⁴ HM.....	17,3	11,9	6,2	35,4	5	5	5	15

Variation de la respiration totale (RT) et de la respiration d'entretien (RE) en cm³ de CO₂ émis par 1 fragment.

Si Np₁ et Np₂ sont les quantités respectives d'N protéique pendant une période comprise entre les temps t₁ et t₂ (en jours), la respiration d'entretien RE sera égale à la somme des 2 termes suivants :

1° respiration d'entretien de la matière tissulaire initiale : $1 \times Np_1 \times (t_1 - t_2)$.

2° respiration d'entretien de la matière tissulaire synthétisée pendant la période considérée, en supposant l'accroissement de protéines proportionnel au temps pendant cette période ; ce second terme est égal à $1 \times \frac{Np_2 - Np_1}{2} (t_1 - t_2)$.

On a alors :

TABEAU VIII
Tissus de xylème de tubercule de Scorsonère.

Périodes	RT-RE (1)				Δ Np (2)			RT-RE / Δ Np		
	0-8 j	8-15 j	15-22 j	0-22 j	0-8 j	8-15 j	15-22 j	0-8 j	8-15 j	15-22 j
Témoin ANA	8,8	4,7	0,9	14,4	0,73	0,59	—	12	7,9	—
10 ⁻⁷ ANA	9,1	10,3	7,7	27,1	0,68	0,61	0,09	13	16,8	154
10 ⁻⁶ ANA	9	11,6	10,2	30,8	0,88	0,55	0,28	13,2	19,2	36
10 ⁻⁵ ANA	13,1	19	13,4	45,5	1,01	0,28	0,02	13	67	—
10 ⁻⁴ ANA	9,6	10	8	27,6	0,19	0,20	0,01	50	50	—
Témoin LdC	7,4	4,1	2,8	14,3	0,59	0,11	0,12	12,3	37,2	23
2 ^o . LdC	7,5	6,3	4,4	17,4	0,84	0,49	0,03	8,9	12,8	—
10 ^o . LdC	8,7	11,2	10,6	30,5	1,38	0,03	0,25	7,9	—	42
Témoin HM	11	8,7	6,2	25,9	0,71	0,48	0,04	15,5	18,1	155
10 ⁻⁵ HM	11,4	9,4	1	27,8	0,32	0,34	0,12	35	27,6	58,3
10 ⁻⁴ HM	12,3	6,9	1,2	20,4	0,18	0,01	—	66	—	—

Variations de la respiration de croissance RT-RE, de l'accroissement d'N protéique (Δ Np) et du coefficient respiratoire de croissance RT-RE / Δ Np :

(1) en cm³ de CO₂ émis par 1 fragment ;

(2) en mg d'N protéique pour 1 fragment.

$$RE = 1 \times (t_2 - t_1) \left(Np_1 + \frac{Np_2 - Np_1}{2} \right) = \frac{(t_2 - t_1) (Np_1 + Np_2)}{2} \text{ cm}^3.$$

La respiration totale RT d'un fragment, pendant la même période, est calculée comme il a été indiqué précédemment (page 44) à l'aide de la formule :

$$RT = 24 \times (t_2 - t_1) \times \frac{IRc_1 + IRc_2}{2} \text{ cm}^3.$$

IRc_1 et IRc_2 sont les intensités respiratoires d'un fragment aux temps t_1 et t_2 .

Les valeurs de RT et de RE, ainsi obtenues, figurent dans le tableau VII.

La différence $RT - RE$ représente la *respiration de croissance*.

b) *Discussion des résultats*. Si les hypothèses formulées ont quelque valeur, la respiration de croissance, définie par la différence $RT - RE$, doit correspondre à l'accroissement protéique ΔNp .

Les valeurs de $RT - RE$, de ΔNp et du rapport $RT - RE / \Delta Np$ figurent dans le tableau VIII.

Le rapport $RT - RE / \Delta Np$ est précisément le coefficient respiratoire de croissance défini plus haut. Puisque le QR est très voisin de 1, ce coefficient est analogue au *coefficient respiratoire de croissance* défini par TAMURA et qui est égal à la quantité d'oxygène absorbé en liaison avec la synthèse de 1 g de substance sèche. Le *rendement de la croissance* est égal à l'inverse de ces coefficients.

L'examen du tableau VIII conduit aux remarques suivantes :

i) *1^{re} semaine*. Pendant la première semaine, alors que la protéogenèse est particulièrement intense, les valeurs du *coefficient de croissance*, obtenues avec 6 lots de tissus sur 12 (les trois témoins et les lots ANA 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5}) sont toutes très voisines, malgré des vitesses d'accroissement parfois assez différentes (Témoin LdC et ANA 10^{-5} par exemple). Pour ces 6 lots de tissus, la constance du coefficient justifie les calculs relatifs à cette période.

Les valeurs de $RT - RE / \Delta Np$ sont plus faibles pour les tissus cultivés sur lait de Coco. Au début de la culture, la présence du lait élève légèrement le rendement de la croissance, la formation de nouvelle matière exigeant alors moins d'énergie, ce qui confirmerait les observations de KANDLER (1955) faites avec des tissus anergisés de Vigne (1).

Au contraire, pour les lots ANA 10^{-4} , HM 10^{-5} et HM 10^{-4} , les valeurs sont plus élevées en raison de la faiblesse de l'accrois-

(1) On appelle tissus anergés, des tissus ayant acquis la capacité de proliférer sur des milieux dépourvus d'auxine.

sement protéique. Le rendement de croissance est par suite plus faible.

ii) 2^e semaine. Pendant la seconde semaine, les accroissements de protéines (ΔNp) sont toujours plus faibles.

Pour les lots témoins, les valeurs de la *respiration de croissance* ($RT - RE$) diminuent également. Les *coefficients respiratoires de croissance* varient donc peu. Seul, le lot témoin LdC fait exception, le coefficient augmente en raison d'un accroissement protéique faible.

Avec les tissus cultivés en présence d'ANA, les valeurs de $RT - RE$ augmentent légèrement. L'augmentation la plus sensible est présentée par le lot ANA 10^{-5} , pour lequel l'accroissement de protéines est particulièrement faible. Il en résulte une élévation du *coefficient respiratoire de croissance* ($RT - RE/\Delta Np$) qui devient extrêmement élevé.

Pour les tissus cultivés en présence de lait de Coco, le coefficient augmente légèrement pour le lot LdC 2%. Quant au lot LdC 10%, l'accroissement très faible de la quantité de protéines entraîne une valeur du coefficient respiratoire de croissance qui n'a plus de signification.

Pour les tissus cultivés en présence de 10^{-4} d'HM, il n'y a plus de protéogenèse et $RT - RE$ ne peut plus être assimilée à la respiration de croissance. La toxicité de l'inhibiteur s'oppose aux utilisations normales de l'énergie respiratoire.

iii) 3^e semaine. Pendant la troisième semaine, les valeurs de $RT - RE$ diminuent, tout en restant cependant élevées. Les rapports $RT - RE/\Delta Np$ n'ont plus de signification, puisque les accroissements en N protéique sont pratiquement nuls. Seuls les lots ANA 10^{-6} et LdC 10% manifestent encore une protéogenèse notable. Celle-ci se fait cependant avec un rendement faible.

Si les hypothèses et calculs proposés donnent une interprétation assez cohérente des faits pendant la première semaine de culture, il n'en est plus de même pour les deux semaines qui suivent.

Plus les tissus sont âgés, plus les échanges respiratoires, rapportés aux quantités de protoplasme synthétisé, sont élevés. TAMURA et YAMAGUCHI (1933) ont également montré que le *coefficient respiratoire de croissance* augmente avec l'âge des tissus.

De plus, lorsque le protoplasme ne croît plus ($\Delta Np = 0$), les hypothèses émises précédemment ne peuvent plus rendre compte de l'utilisation de l'énergie liée aux échanges gazeux. Lorsque le poids de substance sèche augmente alors que la quantité de protéines reste constante (témoins pendant la 3^e semaine), on peut admettre que $RT - RE$ correspond à l'énergie nécessitée par la synthèse des composés inertes. Mais cette explication n'est plus exacte lorsque le poids de substance sèche reste constant (ANA 10^{-5})

ou même diminue (ANA 10⁻¹). Dans ces cas, on peut admettre par contre que les tissus exigent beaucoup plus d'énergie pour leur entretien. Le *coefficient respiratoire d'entretien* ne serait donc pas constant ainsi qu'il a été supposé pour la commodité des calculs. *Il augmenterait avec l'âge des tissus dont les exigences énergétiques d'entretien comme de croissance ne cesseraient de s'élever.*

5° *Conclusions. Le métabolisme des fragments de xylème de tubercules de Scorsonère cultivés in vitro.*

a) *Métabolisme des témoins.* L'épluchage et la fragmentation des tissus entraînent une légère augmentation des échanges gazeux respiratoires. On observe également une oxydation des polyphénols et une diminution du QR.

La modification du métabolisme est sans commune mesure avec les perturbations apportées par la mise en culture des fragments. En 24 heures, l'afflux de glucose provenant du milieu provoque une très forte augmentation de l'activité du protoplasme. La dégradation des glucides entraîne la genèse transitoire d'hydrogène réducteur, de chaînons carbonés intermédiaires et de liaisons phosphates riches en énergie. Les nitrates du milieu sont réduits. On a ainsi tous les facteurs nécessaires à une protéogenèse intense.

La protéogenèse se poursuit pendant toute la première semaine. La quantité de protoplasme augmente, il en résulte un accroissement des échanges respiratoires des colonies. Cependant l'activité de l'unité de masse protoplasmique diminue. Cette diminution peut être due à une synthèse plus lente des protéines respiratoires. Pendant cette période, la synthèse de la quantité de tissus contenant 1 mg d'N protéique exige l'oxydation de 15 à 19 mg de glucose correspondant à un volume de CO₂ émis compris entre 12 et 15 cm³.

Pendant la seconde semaine, les synthèses protéiques se poursuivent, mais avec une vitesse moins grande. Les quantités de glucides solubles diminuent. Les glucides sont utilisés plus rapidement qu'ils ne sont absorbés. La synthèse des substances inertes non caractérisées est active. Les échanges respiratoires totaux varient peu. L'activité respiratoire de l'unité de masse protoplasmique diminue. La synthèse de nouveau protoplasme se fait avec un rendement plus faible.

La protéogenèse cesse pendant la troisième semaine. Le poids de substance sèche augmente encore à la suite de synthèses de composés inertes. La quantité de CO₂ émis par un fragment est plus faible par suite de la diminution de l'activité du protoplasme. Les tissus exigent beaucoup plus d'énergie pour assurer leur entretien.

Pendant toute la durée de l'expérience, les tissus témoins

transforment environ 50% des glucides utilisés en CO_2 . Cette perte est largement compensée par l'apport de glucose externe et le poids de substance sèche augmente.

b) *Influence de l'acide α -naphthalène-acétique.* Avec les concentrations physiologiques de 10^{-7} et 10^{-6} en ANA, la protéogenèse continue pendant la 3^e semaine, et l'absorption de l'eau ainsi que celle du glucose sont plus intenses que dans les témoins. Pendant la première semaine, les synthèses se font avec un rendement identique à celui des témoins. Ensuite, la chute de l'activité de l'unité de masse protoplasmique est beaucoup moins prononcée que celle observée avec les lots témoins. Pour un même accroissement tissulaire, les échanges gazeux sont plus importants. Malgré la dégradation plus rapide des glucides, les réserves des tissus ne sont pas épuisées en fin d'expérience. L'augmentation du poids de substance sèche est du même ordre de grandeur que pour les témoins.

Avec la concentration de 10^{-5} en ANA, la synthèse protéique est extrêmement active pendant la première semaine et se fait avec un rendement égal à celui calculé pour les témoins. Ultérieurement les échanges gazeux respiratoires sont très élevés par rapport à l'accroissement des tissus. La consommation des glucides, principalement dans les dégradations, l'emporte sur l'absorption du glucose externe, bien que cette absorption soit considérable. Il en résulte une forte diminution des réserves glucidiques, et malgré l'accroissement des protéines et des substances membranaires, le poids de substance sèche varie peu. Les tissus sont plus fragiles et consomment beaucoup plus de glucides pour leur entretien. A cette concentration, l'ANA exerce une action pathologique, la perte de substances azotées solubles au profit du milieu, accompagne la nécrose des tissus. La mort intervient brusquement au début de la quatrième semaine : les fragments brunissent en quelques heures et les échanges gazeux cessent.

A la concentration de 10^{-4} , l'ANA exerce une action nettement pathologique. Les tissus n'absorbent pas les substances nutritives du milieu. Le bilan théorique et le dosage du glucose du milieu montrent qu'aucune quantité de glucose externe n'est prélevée. Les dosages d'N montrent qu'une partie des substances azotées solubles est transformée en protéines tandis qu'une autre partie est excrétée. Les glucides utilisés sont empruntés aux réserves qui sont presque épuisées en fin d'expérience. La totalité est dégradée avec émission de CO_2 . L'accroissement de substances membranaires est négligeable. Tous ces faits contribuent à la diminution du poids de substance sèche. Pendant la période de culture, les tissus ont absorbé une quantité d'eau voisine de celle prélevée par les témoins, ce qui souligne la différence qui existe

entre le mécanisme d'absorption de l'eau et celui de l'absorption des sels et des métabolites. Ces résultats sont en accord avec ceux de HANSON et BONNER (1954).

L'ensemble de ces observations complète sur le plan physiologique les descriptions morphologiques et histologiques faites par GAUTHERET (1942 a et b, 1955 a).

c) *Influence du lait de Coco.* Les tissus cultivés en présence de lait de Coco sont essentiellement caractérisés par une protéogenèse beaucoup plus intense. Pendant la première semaine, celle-ci se fait avec un rendement plus élevé que dans tous les cas précédents. Les échanges gazeux respiratoires sont également très élevés, à la suite de la forte augmentation de la quantité de protoplasme. Cependant l'activité de l'unité de masse protoplasmique diminue comme le fait celle des tissus témoins.

Les synthèses des substances membranaires sont également importantes. L'utilisation des glucides est considérable et le CO_2 émis représente, comme pour les témoins, environ 50% du glucose total utilisé. Les pertes sont amplement compensées par les apports provenant du milieu et l'accroissement du poids de substance sèche est très accentué.

d) *Influence de l'hydrazide maléique.* Les fragments cultivés en présence de cette substance ont un métabolisme ralenti comparé à celui des témoins. Le ralentissement est très sensible avec la concentration de 10^{-4} . La protéogenèse est très peu active. Il en est de même de l'absorption d'eau et des aliments. Celle de glucose n'est visible que pendant la première semaine alors que le poids de substance sèche augmente légèrement. L'activité respiratoire est alors presque aussi élevée que celle des témoins. L'énergie fournie n'est pratiquement pas utilisée pour les synthèses. Il semble que pour ces tissus, les mécanismes de transfert d'énergie fonctionnent mal.

III. — ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE DES COLONIES DE TISSUS DE CROWN-GALL DE SCORSONÈRE AYANT SUBI DE NOMBREUX REPIQUAGES

A. — EXPÉRIENCES.

L'étude de la physiologie des colonies de tissus de crown-gall de Scorsonère a été faite en partant de cultures issues de la souche isolée par GAUTHERET en 1947 (voir GAUTHERET, 1948) et repiquée périodiquement depuis cette époque.

Deux expériences sont réalisées :

— 1^o L'une concerne l'influence de l'acide α -naphtalène-acétique et porte sur trois lots de cultures : un lot témoin et deux lots cultivés respectivement en présence de 10^{-8} et 10^{-6} d'ANA.

— 2^o La seconde concerne l'influence du lait de Coco et porte sur trois lots de cultures : un lot témoin et deux lots cultivés en présence de 2% et de 10% de lait de Coco.

Dans la suite de l'exposé, les abréviations suivantes sont utilisées pour désigner les 6 lots étudiés : Témoin ANA, ANA 10^{-8} , ANA 10^{-6} , Témoin LdC, LdC 2%, LdC 10%.

Chaque lot comprend au moins 220 explantats mis en culture. Cent vingt sont utilisés pour l'analyse des échanges gazeux et des groupes de constituants azotés, 100 pour l'analyse des glucides.

Chaque explantat, découpé en cube de 0,5 cm de côté dans des colonies âgées de 10 semaines, estensemencé sur une quantité de milieu mettant à sa disposition 1,6 g de glucose et 2,8 mg d'N nitrique.

Les différentes analyses sont faites sur des colonies prélevées après 1, 8, 15, 30 et 45 jours de culture. Le nombre de colonies par enceinte respiratoire est de 12 pour les tissus repiqués depuis 24 heures. A mesure que les colonies s'accroissent, un plus petit nombre est utilisé. Au 45^e jour, le prélèvement n'est plus que de 3 fragments pour une enceinte respiratoire.

B. — RÉSULTATS.

1^o *Variations du poids des colonies et de leur teneur en eau.*

Le volume et le poids de tous les lots de tissus ont augmenté. Aucune modification morphologique particulière ne s'est manifestée.

Le tableau IX indique les variations des poids de substance fraîche et de substance sèche.

a) *Variations du poids de substance fraîche.* L'augmentation est continue pour tous les lots.

Le poids du témoin ANA est multiplié par 8 après 6 semaines. Celui du témoin LdC par 10.

A la concentration de 10^{-8} , l'ANA paraît n'avoir aucune influence. La concentration de 10^{-6} est légèrement inhibitrice ; l'augmentation de poids est alors plus faible que celle des témoins.

Comme l'a montré DUHAMET (1950 b), le lait de Coco à la concentration de 10% provoque une augmentation considérable du poids de substance fraîche.

b) *Variations du poids de substance sèche.* L'accroissement du poids de substance sèche est également continu pour tous les lots de tissus.

L'accroissement du témoin ANA est plus faible que celui du

TABLEAU IX

Tissus de crown-gall de *Scorsonère*.

Jours	Substance fraîche					Substance sèche				
	1	8	15	30	45	1	8	15	30	45
Témoin ANA	124	178	273	714	933	11	18	26	59	75
10 ⁻⁸ ANA	130	166	266	904	1096	11	17	26	65	89
10 ⁻⁶ ANA	118	149	241	471	657	10	14	23	38	68
Témoin LdC	115	175	232	822	1136	11	17	24	74	127
2% LdC	125	200	366	981	1225	11	21	35	87	141
10% LdC	126	213	403	1080	1439	12	26	41	99	185

Variations des poids de substance fraîche et de substance sèche d'une colonie, en mg.

témoin LdC. L'expérience avec l'ANA a été réalisée durant l'été 1953 ; l'expérience avec le lait de Coco a été réalisée pendant l'automne de la même année. HELLER (1953) a déjà signalé de telles variations saisonnières. Les différences d'accroissement entre les deux témoins ne sont sensibles qu'à partir de la seconde semaine. De telles observations soulignent la nécessité de répéter les cultures témoins pour chaque expérience.

La présence d'ANA n'influe que discrètement sur les variations du poids de substance sèche. Avec 10^{-3} , il semble y avoir une légère augmentation par rapport au témoin et, avec 10^{-6} , une faible diminution.

La présence de lait de Coco provoque au contraire une augmentation du poids de substance sèche des colonies. Cette augmentation est particulièrement sensible pour le lot LdC 10%.

c) *Variations de la teneur en eau.* Les variations de l'hydratation, au cours de la durée de culture, sont de faible amplitude. Pour tous les lots, une légère diminution de la teneur en eau (de 1000 à 850 mg d'eau pour 100 mg de substance sèche) intervient pendant la première semaine. Elle est suivie d'une légère augmentation qui se poursuit jusqu'à la quatrième semaine.

La teneur en eau des tissus cultivés en présence de lait de Coco diminue pendant les 15 derniers jours de culture (elle atteint alors 680 mg d'eau pour 100 mg de substance sèche), alors que le poids des tissus croît fortement. Les variations sont moins accentuées pour les tissus cultivés en présence d'ANA.

2° *Variations des groupes de substances azotées.*

Le tableau X indique les quantités d'N total, d'N protéique, d'N soluble organique et d'N nitrique en μg d'N par colonie.

a) *Quantités d'azote.* Les formes azotées de tous les lots de tissus augmentent légèrement au cours de chaque expérience.

Dans l'expérience utilisant l'ANA, les quantités d'N protéique du témoin sont plus faibles et les quantités d'N soluble plus élevées que dans l'expérience utilisant le lait de Coco. On retrouve à ce propos les variations saisonnières mentionnées plus haut.

En présence de 10^{-6} d'ANA, la synthèse des substances azotées est freinée, le ralentissement est sensible pour les substances solubles.

Le lait de Coco favorise considérablement la synthèse des protides. Ainsi, avec la concentration de 10%, la quantité d'N protéique d'une colonie est multipliée par 17 après 6 semaines, alors qu'elle n'est multipliée que par 11 pour le témoin LdC.

A partir du 15^e jour, on retrouve des nitrates dans tous les lots de tissus, à l'exception du lot LdC 10%. En présence de 10^{-6} d'ANA, la quantité de nitrates est assez élevée en fin de culture,

TABLEAU X
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

Lots de tissus	Jours	Quantités d'N en μg par colonie			
		N total	N nitrique	N protéique	N soluble organique
Témoin ANA	1	135	—	73	62
	8	224	—	137	87
	15	378	7	246	115
	30	818	20	491	307
	45	1016	27	598	391
ANA 10^{-8}	1	144	—	83	61
	8	212	—	133	79
	15	394	10	236	148
	30	916	15	558	343
	45	1065	60	675	330
ANA 10^{-6}	1	119	—	68	51
	8	199	—	110	89
	15	328	10	210	108
	30	451	47	304	100
	45	667	76	447	144
Témoin LdC	1	129	—	85	44
	8	199	—	131	68
	15	243	7	228	108
	30	832	10	614	318
	45	1475	15	965	495
LdC 2 %	1	127	—	85	42
	8	250	—	162	88
	15	513	6	350	157
	30	1166	10	765	391
	45	1814	10	1198	606
LdC 10 %	1	147	—	92	55
	8	319	—	197	122
	15	709	—	492	217
	30	1376	—	861	515
	45	2486	—	1552	934

Variations des groupes de substances azotées

alors que la quantité d'N organique soluble augmente très peu. Les tissus semblent alors présenter des difficultés à réduire l'azote nitrique.

b) *Teneurs en azote.* Pour tous les lots de tissus, sans exception, la teneur en N protéique augmente en début de culture, particulièrement pendant la seconde semaine (fig. 3, p. 67). La vitesse de la protéogenèse est alors plus grande que la vitesse des autres synthèses. Après 15 jours, la diminution de la teneur en N protéique traduit une genèse plus rapide des constituants non azotés.

La présence d'ANA ne provoque pas de modification sensible de la teneur en N protéique. Elle entraîne cependant, à la concentration de 10^{-6} , une diminution de la teneur en substances azotées solubles, avec élévation concomitante de la teneur en nitrates.

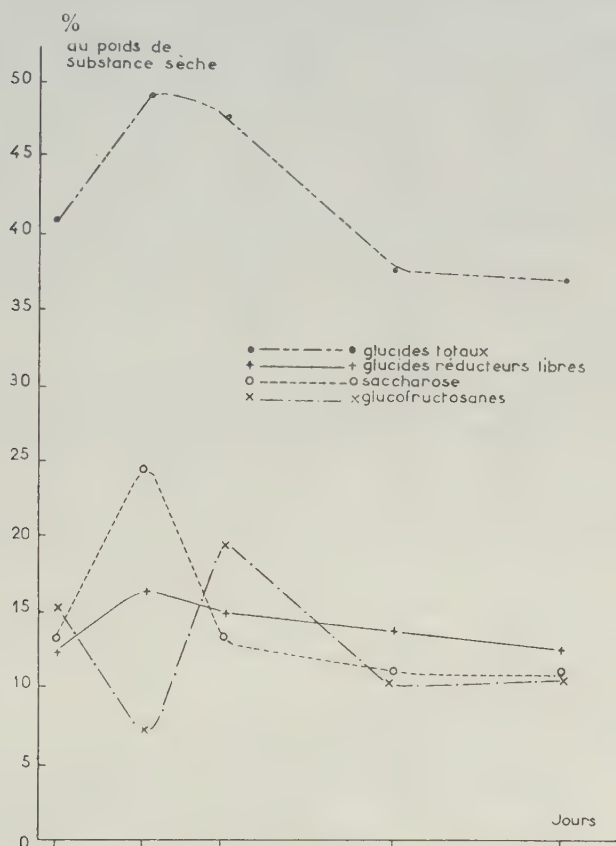


Fig. 2. — Variations des teneurs en glucides de colonies tissulaires de Crown-gall de Scorsonère (Lot témoin ANA).

Les plus fortes teneurs en N protéique (1,2 mg d'N pour 100 mg de substance sèche) sont constatées lorsque du lait de Coco est présent dans le milieu.

3° Variations des glucides solubles.

Le tableau XI indique les variations des quantités de glucides solubles en mg de glucose par colonie.

TABLEAU XI
Tissus de grown-gall de Scorsonère.

Lots de tissus	Jours	Quantités de glucides en mg de glucose par colonie			
		Glucides totaux	Glucides réducteurs libres	Saccharose	Glucofructosanes
Témoin ANA	1	4,5	1,4	1,5	1,6
	8	8,8	3,0	4,5	1,3
	15	12,5	3,9	3,4	5,2
	30	21,7	8,1	7,4	6,2
	45	28,3	9,5	9,4	9,4
ANA 10 ⁻⁸	1	5	1,5	1,6	1,9
	8	7,6	2,6	3,1	1,9
	15	12,4	3,1	3,5	5,8
	30	23,8	7,9	10,3	5,6
	45	34,8	10,5	12,8	11,5
ANA 10 ⁻⁶	1	4,2	1,2	1,4	1,6
	8	5,9	2,3	2,5	1,1
	15	8,1	2,8	2,9	1,4
	30	12,5	4	3,9	4,6
	45	23,3	7,8	6,5	9
Témoin LdC	1	4,7	1,4	1,6	1,7
	8	9,1	2,6	4,5	2
	15	11,8	3,2	2,8	5,8
	30	29	9,5	8,3	11,2
	45	48,4	15,9	16	16,5
LdC 2 %	1	4,6	1,4	1,2	1,4
	8	11,4	3,1	5,8	2,5
	15	16,8	4,7	4,8	7,3
	30	32,7	11,1	9,7	11,9
	45	54	18,2	17,8	18
LdC 10 %	1	5,3	1,3	1,8	2,2
	8	14,6	3,5	6,7	4,9
	15	19,5	5,4	4,6	9,5
	30	37,8	11,7	11,5	14,6
	45	72,3	22,7	25,7	23,9

Variations des glucides solubles.

Les tissus étudiés sont riches en glucides solubles (40 % du poids de substance sèche). Les quantités de glucides réducteurs libres, de saccharose et de glucofructosanes, sont sensiblement équivalentes au départ.

Pour tous les tissus, la quantité de glucides totaux d'une colonie croît régulièrement pendant les expériences.

Les proportions entre les différentes fractions glucidiques varient au début de la culture.

Pendant la 1^{re} semaine, les quantités de saccharose s'élèvent tandis que les quantités de glucosfructosanes restent sensiblement constantes (la teneur en ces composés diminue donc, en raison de l'augmentation du poids de substance sèche (fig. 2). Après une semaine, la teneur en glucides totaux est très élevée, elle peut dépasser 50% du poids de substance sèche.

Au cours de la seconde semaine, des variations inverses se manifestent : diminution des teneurs en saccharose et augmentation des teneurs en glucosfructosanes. Tout en restant élevée, la concentration en glucides totaux des tissus diminue légèrement durant cette période.

Ensuite, les quantités des trois formes glucidiques redeviennent sensiblement égales entre elles. Leur somme représente un peu moins de 40% du poids de substance sèche.

L'action des substances de croissance sur les teneurs en glucides des tissus est assez discrète ; elle n'est pas suivie de variations vraiment significatives.

4^o *Utilisation des glucides du milieu.*

Les quantités de glucose prélevées dans le milieu varient pour les différentes cultures, dans le même sens que les accroissements pondéraux des colonies.

Après 6 semaines, 143 mg de glucose sont prélevés par une colonie du lot témoin ANA sur les 1600 mg mis à sa disposition, tandis que seulement 98 mg sont prélevés par 1 colonie du lot ANA 10⁻⁶. Les tissus cultivés sur 2% et 10% de lait de Coco consomment respectivement 268 et 325 mg de glucose par colonie, alors que ceux du lot témoin LdC n'en utilisent que 183 mg.

5^o *Variations de l'intensité des échanges gazeux respiratoires.*

Le tableau XII indique les variations de l'intensité respiratoire des différents lots. Comme précédemment, cette intensité est exprimée soit par colonie (IRc), soit par g de substance sèche (IRs), soit par mg d'N protéique (IRNp).

— a) Les variations de l'IRc traduisent l'augmentation des échanges gazeux en fonction de la taille des colonies.

— b) L'IRs s'élève pour tous les lots de tissus au cours de la première semaine (LIORET, 1952 a et b, 1955). Pendant la seconde semaine, cette intensité ne varie pas sensiblement. Il existe peut-être un maximum entre le 8^e et le 15^e jour, sauf pour les tissus cultivés en présence du lait de Coco, pour lesquels l'augmentation se poursuit jusqu'au 15^e jour (LIORET, 1952 b, 1955). Ensuite, les IRs diminuent pour tous les lots de tissus et particulièrement pendant les deux dernières semaines. Cette évolution est tout à

TABLEAU XII
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

	Jours	IRC (1)	IRS (2)	IRNp (3)
Témoin ANA	1	12	1091	165
	8	24	1333	181
	15	36	1384	145
	30	66	1118	132
	45	70	933	118
ANA 10 ⁻⁸	1	12	1091	152
	8	24	1412	182
	15	35	1346	151
	30	67	1030	146
	45	79	887	117
ANA 10 ⁻⁶	1	11	1100	163
	8	19	1337	179
	15	31	1345	136
	30	36	947	117
	45	51	750	113
Témoin LdC	1	11	1000	133
	8	20	1117	146
	15	27	1125	115
	30	73	1013	120
	45	117	927	121
LdC 2%	1	11	1000	129
	8	26	1238	160
	15	50	1428	142
	30	91	1046	118
	45	141	1000	118
LdC 10%	1	12	1091	134
	8	35	1346	180
	15	54	1611	110
	30	103	1040	118
	45	182	983	117

Variations de l'intensité respiratoire :

- 1) en mm³ de CO² émis par heure et par colonie tissulaire ;
- 2) en mm³ de CO² émis par heure et par g de substance sèche ;
- 3) en mm³ de CO² émis par heure et par mg d'N protéique.

fait comparable à celles constatées par PLANTEFOL (1938) et LACHAUX (1944 d) pour d'autres tissus en culture.

— c) L'IRNp varie au cours des expériences d'une façon analogue pour tous les lots de tissus.

On observe une augmentation au cours de la première semaine, puis une diminution durant la seconde. L'IRNp finit par se stabiliser aux environs de 115-120 mm³ de CO₂ émis par heure et par mg d'N protéique.

6° *Variations des quotients respiratoires.*

Les quotients s'élèvent pendant le début de la culture pour atteindre des valeurs proches de 1,1 après deux semaines, moment où les synthèses protéiques sont très intenses. Ils diminuent ensuite et après 6 semaines leurs valeurs sont très voisines de 1.

C. — INTERPRÉTATIONS ET DISCUSSION.

1° *La croissance des colonies. Accroissements relatifs des divers constituants.*

Avec les colonies de tissus de crown-gall, les mesures des poids de substance fraîche et de substance sèche et les mesures des quantités des constituants azotés et glucidiques, ont fourni des valeurs qui augmentent d'une façon continue pendant la durée de culture. Cependant, on ne peut pas affirmer que la croissance de ces tissus résulte de l'accroissement homogène des divers constituants cellulaires. En effet, l'étude des teneurs en substances azotées et glucidiques montre qu'elles varient en fonction de l'âge des colonies et, dans une moindre mesure, en fonction de la présence de substances de croissance.

Dans le tableau XIII figurent les teneurs en protéines, en glucides solubles et en constituants cellulaires inertes non caractérisés des lots de tissus qui ont présenté les variations extrêmes.

Les teneurs en protéines sont calculées en multipliant les données du tableau X par 6,25. Les teneurs en glucides sont celles du tableau XI corrigées, pour les polyholosides, de la perte de l'eau de condensation (voir note page 45). Le complément à 100 de la somme des deux valeurs précédentes correspond à la proportion des constituants inertes non caractérisés. On y trouve donc les substances azotées solubles qui sont en petites quantités et dont les variations sont de très faible amplitude.

Les différences entre les divers lots de crown-gall sont moins importantes que celles décrites à propos des fragments de xylème de tubercule (page 40). La proportion des substances inertes différentes des glucides solubles diminue pendant les premières semaines de culture. Elle devient inférieure à 50% du poids de substance sèche. Ensuite, elle s'élève et atteint près de 60% en fin d'expérience. La plus forte teneur en substances inertes est observée en présence de 10^{-6} d'ANA.

2° *Les variations de l'intensité respiratoire.*

La quantité de CO_2 émis en un temps donné par une colonie (IRc) augmente continuellement au cours de l'expérience, à mesure que la taille de la colonie croît.

L'étude de l'IRs et de l'IRNp des tissus de crown-gall met

en évidence trois périodes successives illustrées par les courbes de la figure 3.

— Pendant la première période, qui s'étend sur la première semaine, l'augmentation de l'intensité par unité de masse (IRs) résulte de deux facteurs :

TABLEAU XIII
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

	Jours	Protéines	Glucides solubles	Autres constituants cellulaires
Témoin ANA	1	4	38	58
	8	5	47	48
	15	6	45	49
	45	5	36	59
ANA 10 ⁻⁶	1	4	40	56
	8	5	41	54
	15	6	33	61
	45	4	32	64
Témoin LdC	1	4	41	55
	8	5	52	43
	15	6	42	52
	45	5	36	59
LdC 10 %	1	4	42	54
	8	5	53	42
	15	7,5	42	50,5
	45	5	37	58

Variations des teneurs en protéines, en glucides solubles et en autres constituants cellulaires, en mg pour 100 mg de substance sèche.

— 1^o) la plus grande proportion de protoplasme, due à la synthèse rapide des protéines traduite par l'augmentation de la teneur en N protéique.

— 2^o) l'augmentation de l'activité du protoplasme traduite par l'augmentation de l'IRNp.

— Pendant la seconde période, qui s'étend sur la seconde semaine, l'IRs des tissus témoins et des tissus cultivés en présence d'ANA est stable. L'IRNp diminue alors que la teneur en protéines continue à augmenter. Il se forme donc du protoplasme moins actif que le précédent. Mais, puisque l'IRs est constante, l'augmentation de la quantité relative de protoplasme masque la diminution de son activité. Pendant cette même période, l'IRs des

tissus cultivés en présence de lait de Coco continue à augmenter comme pendant la première semaine. Cette augmentation de l'IRs résulte d'une forte élévation de la teneur en protéines. Cependant, l'IRNp diminue, traduisant une diminution de l'activité du protoplasme. Les effets de cette diminution sur l'activité de

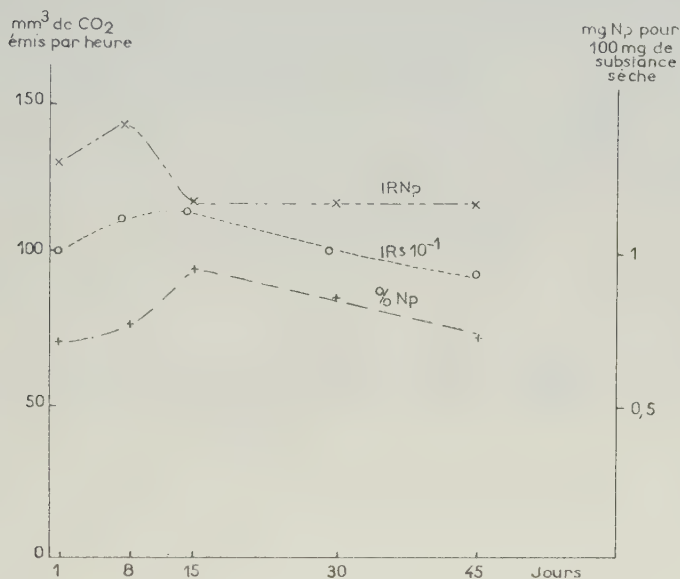


Fig. 3. — Variations de l'Intensité respiratoire exprimée par g de substance sèche (IRs) de l'Intensité respiratoire exprimée par mg d'N protéique (IRNp) et de la teneur en N protéique (% Np) de tissus de Crown-gall de Scorsonère (Lot témoin LdC).

l'unité de masse tissulaire (IRs) sont annulés à la suite de l'augmentation de la teneur en protéines. Les phénomènes sont tout à fait semblables à ceux décrits dans l'étude des fragments de racines, lorsque l'élévation de la teneur en protéines s'accompagne d'un abaissement de l'activité du protoplasme. On peut également expliquer ces variations par une synthèse moins rapide des protéines respiratoires.

— Pendant la période suivante, qui se poursuit jusqu'à la fin des expériences, les trois paramètres considérés (IRs, IRNp et teneur en protéines) diminuent, principalement pendant la seconde quinzaine. Ensuite, les diminutions sont moins accentuées pour l'IRs et la teneur en protéines. L'IRNp se stabilise à une valeur voisine de 118 mm^3 de CO_2 émis par heure et par mg d'N protéique.

3° *L'utilisation des glucides.*

L'évaluation des différentes formes d'utilisation du glucose a été faite comme précédemment, lors de l'étude des fragments de tubercule (voir page 44).

La quantité de glucose transformé en substances organiques azotées solubles n'a pas été calculée, le rapport carbone/azote n'étant pas suffisamment précis. Ces substances sont en faibles quantités, et une erreur de 100% sur le carbone correspondant à l'N soluble ne provoquerait qu'une erreur de 2% sur la quantité totale de glucose utilisé. Aussi, ont-elles été groupées avec les autres substances carbonées inertes.

TABLEAU XIV
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

	au CO ² émis	Glucose correspondant			Glucose pris au milieu calculé	Glucose pris au milieu mesuré
		aux Protéines	aux Glucides métabo- lisables	aux Substan- ces car- bonées inertes		
Témoin ANA	67	+ 4	+ 24	+ 38	133	143
10 ⁻⁸ ANA	69	+ 4,5	+ 29	+ 46	148,5	165
10 ⁻⁶ ANA	45	+ 3	+ 19	+ 38	105	98
Témoin LdC	77	+ 7	+ 44	+ 69	197	183
2 % LdC	100	+ 9	+ 49	+ 77	235	268
10 % LdC	121	+ 11,5	+ 67	+ 99	298,5	325

Bilan de l'utilisation de glucose en mg après 6 semaines de culture *in vitro*.

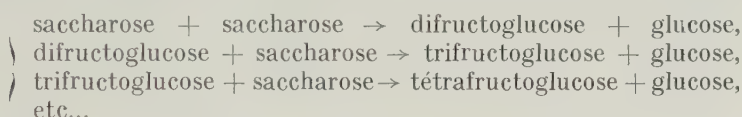
Le tableau XIV indique les résultats obtenus. Il permet de comparer les quantités de glucose utilisé, obtenues par le calcul, et les quantités expérimentales fournies par l'analyse des milieux. La correspondance est satisfaisante. Les différences ne dépassent pas 15%. Les écarts les plus sensibles entre les deux valeurs concernent les tissus cultivés en présence de lait de Coco.

La proportion du glucose dégradé et transformé en CO₂ par rapport au glucose prélevé dans le milieu est inférieure à 50%. Cette proportion est plus faible que celle constatée avec les fragments de tubercule de Scorsonère. Le rendement des transformations matérielles est donc meilleur.

L'examen du tableau XI et des courbes de la figure 2 montre que les tissus accumulent des glucides solubles pendant la pre-

mière semaine. Pendant cette période, l'absorption du glucose externe est plus rapide que l'utilisation des glucides solubles des tissus. Si la teneur en glucides réducteurs libres augmente légèrement, la majeure partie du glucose absorbé est transformée en saccharose qui s'accumule. Les glucofructosanes plus condensés ne sont pas synthétisés immédiatement, leurs quantités ne varient que très faiblement et les teneurs correspondantes diminuent.

Pendant la seconde semaine, la teneur en glucides solubles totaux diminue légèrement pour presque tous les lots. La diminution est un peu plus accentuée pour les tissus du lot ANA 10⁻⁶. La teneur en glucides réducteurs libres diminue faiblement. L'accumulation de saccharose, constatée au début, n'est que transitoire et fait place à une diminution progressive, parallèle à une augmentation de la teneur en glucofructosanes. DEDONDER (1952) a mis en évidence dans les racines de Topinambour un enzyme, l'*inulo-sucrase*, qui catalyse la synthèse des glucofructosanes selon les réactions suivantes :



Les variations mentionnées s'accordent assez bien avec ces faits.

— Durant les troisième et quatrième semaines, la teneur en glucides solubles totaux diminue, l'absorption du glucose externe est alors moins rapide que l'utilisation des glucides des tissus. Les trois formes glucidiques : réducteurs libres, saccharose et glucofructosanes, sont en quantités égales.

— Durant les cinquième et sixième semaines, la teneur en glucides ne varie pas, la vitesse de l'absorption est alors égale à la vitesse de l'utilisation.

La présence de substances de croissance dans le milieu affecte peu les variations des glucides solubles. Les résultats relatifs aux tissus cultivés sur lait de Coco, diffèrent de ceux de GORIS et DUHAMMER (1957) qui ont obtenu une diminution sensible des teneurs en saccharose et en inuline pour les mêmes tissus cultivés en présence de 10% de lait de Coco.

1° *L'utilisation de l'énergie libérée par les oxydations respiratoires.*

Avec des tissus cultivés depuis plusieurs années et ayant subi de multiples repiquages, il est plus difficile de réaliser des cultures qui ne s'accroissent pas, tout en restant dans un bon état physiologique. Les ordres de grandeur des quantités de CO₂ émis, corres-

pendant à l'entretien et à la croissance des tissus, ont été obtenus indirectement par calcul, en s'inspirant de TAMIYA et YAMAGUTCHI (1933).

Pour une période quelconque, la respiration totale RT d'une colonie en croissance est égale à la respiration de croissance RC augmentée de la respiration d'entretien RE.

$$\begin{aligned} \text{or} \quad & RT = RC + RE & (1) \\ & RC = \Delta Np \times \lambda & (2) \end{aligned}$$

ΔNp = accroissement de l'N protéique au cours de cette période.
 λ (coefficient respiratoire de croissance) = quantité de CO_2 émis en relation avec la synthèse d'une quantité de tissus renfermant 1 mg d'N protéique.

$$RE = QE \left(Np_0 + \frac{\Delta Np}{2} \right) \quad (3) \quad (1)$$

QE (*Coefficient respiratoire d'entretien*) = quantité de CO_2 en relation avec l'entretien, pendant la période considérée, d'une quantité de tissu végétal renfermant 1 mg d'N protéique.

Np_0 = quantité initiale d'N protéique de la colonie.

La quantité totale de CO_2 émis par 1 colonie est donc :

$$RT = (\Delta Np \times \lambda) + QE \left(Np_0 + \frac{\Delta Np}{2} \right) \quad (1')$$

a) *Calcul du Coefficient respiratoire d'entretien.* Pour deux périodes successives de durée égale, on a :

$$RT_1 = (Np_2 - Np_1) \lambda + QE \frac{Np_2 + Np_1}{2} \quad (4)$$

$$RT_2 = (Np_3 - Np_2) \lambda + QE \frac{Np_3 + Np_2}{2} \quad (5)$$

RT_1 et RT_2 sont les quantités totales de CO_2 émis par une colonie pendant les deux périodes considérées.

Np_1 , Np_2 et Np_3 sont les quantités d'N protéique de la colonie au début et à la fin de chacune des deux périodes.

Les équations (4) et (5) peuvent être résolues en supposant les 2 inconnues λ et QE constantes pendant les deux périodes successives.

Pour diminuer les erreurs relatives, qui peuvent être élevées en raison des diverses approximations faites, il faut utiliser des

(1) L'équation 3 suppose, comme on l'a fait à propos des fragments de tubercules, que l'accroissement des protéines est proportionnel au temps, pendant la période considérée. L'entretien porte sur les protéines initiales et sur les protéines néoformées. Il concerne les protéines correspondant à $Np_0 + \Delta Np/2$ (Voir page 50).

valeurs assez grandes de RT_1 , RT_2 et de $(Np_2 - Np_1)$ et $(Np_3 - Np_2)$, obtenues après des durées assez longues. Les équations sont finalement établies à partir des résultats correspondant à des périodes de 15 jours.

D'après les équations (4) et (5), le *coefficient respiratoire d'entretien* est égal à :

$$QE = \frac{RT_2 (Np_2 - Np_1) - RT_1 (Np_3 - Np_2)}{Np_2^2 - Np_1 \times Np_3} \quad (6)$$

Le calcul des valeurs de QE (en cm^3 de CO_2 par jour et par mg d'N protéique) a été fait pour tous les lots de tissus. Les systèmes d'équations concernent soit la première et la deuxième quinzaines, soit la deuxième et la troisième quinzaines.

Sur 12 valeurs calculées, 6 sont homogènes (comprises entre 2,5 et 2,8), 3 s'écartent des valeurs précédentes tout en restant assez voisines (1,4 ; 1,4 ; 3,4) et 3 sont incohérentes (12 ; 5,2 ; 0,3). Ces dernières sont obtenues quand le dénominateur de l'équation (6) est petit, c'est-à-dire lorsque Np_2^2 est très peu différent de $Np_3 \times Np_1$, ce qui peut entraîner des erreurs très importantes dans la détermination de QE.

La moyenne des 9 valeurs les plus proches ainsi calculées correspond finalement à un *coefficient respiratoire d'entretien*

QE égal à 2,5 cm^3 de CO_2 émis par jour par mg d'N protéique
ou 0,107 cm^3 de CO_2 émis par heure par mg d'N protéique.

On remarque que la valeur ainsi déterminée pour les colonies de crown-gall est plus élevée que celle des fragments de tubercules obtenue par la détermination des échanges des tissus non ravitaillés en glucose. Il a été signalé à propos de ces fragments que le coefficient adopté (1 cm^3 de CO_2 émis par jour et par mg d'N protéique) était certainement inférieur au coefficient concernant les mêmes tissus après quelques semaines de culture sur le milieu glucosé.

b) *Calcul de la respiration d'entretien et de la respiration de croissance.* A l'aide du coefficient QE, il est possible de calculer la *respiration d'entretien* RE des différents lots de tissus. Le calcul est identique à celui réalisé à propos des fragments d'organes.

Connaissant la respiration totale RT d'une colonie, la différence $RT - RE$ correspond à la *respiration de croissance*. Le tableau XV indique les résultats obtenus par ces calculs.

c) *Discussion des résultats obtenus.* L'examen des valeurs de quotient $\frac{RT - RE}{\Delta Np}$, identique au *coefficient respiratoire de croissance* λ , doit permettre d'établir dans quelle mesure la différence $RT - RE$ peut représenter la *respiration de croissance*,

TABLEAU XV
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

Lots de tissus	Périodes	1	2	3	4	5
		RT (1)	RE (1)	RT-RE (1)	$\lambda = \frac{RT - RE}{\Delta Np}$	RE/RT
Témoin ANA	0-8	3,89	2,40	1,49	23,2	0,62
	8-15	5,04	3,36	1,68	15,5	0,67
	15-30	18,81	13,80	5,01	21,2	0,74
	30-45	24,08	20,40	3,68	34,4	0,85
	0-45	51,82	39,96	11,86	22,5	
ANA 10 ⁻⁸	0-8	3,46	2,16	1,30	26	0,65
	8-15	4,95	3,12	1,83	17,7	0,63
	15-30	18,47	14,89	3,58	11,1	0,81
	30-45	26,35	23,10	3,25	27,7	0,87
	0-45	53,23	43,27	9,96	16,8	
ANA 10 ⁻⁶	0-8	2,94	1,78	1,16	28,1	0,61
	8-15	4,21	2,88	1,33	13,3	0,68
	15-30	11,92	9,63	2,29	24,3	0,81
	30-45	15,59	14,06	1,53	10,7	0,91
	0-45	34,66	28,35	6,31	16,6	
Témoin LdC	0-8	2,97	2,16	0,81	17,6	0,73
	8-15	3,96	3,04	0,92	9,5	0,77
	15-30	18,03	15,78	2,25	5,8	0,88
	30-45	34,200	29,58	4,62	13,1	0,87
	0-45	59,16	50,56	8,60	9,7	
LdC 2 %	0-8	3,61	2,47	1,14	14,8	0,69
	8-15	6,40	4,48	1,92	10,2	0,70
	15-30	25,27	20,89	4,38	10,5	0,83
	30-45	41,76	36,79	4,97	11,4	0,89
	0-45	77,04	64,63	12,41	11,1	
LdC 10 %	0-8	4,51	2,89	1,62	15,9	0,69
	8-15	7,48	5,52	1,96	6,6	0,73
	15-30	28,36	25,35	3,01	8,1	0,84
	30-45	52,48	45,22	7,26	10,5	0,86
	0-45	92,93	78,98	13,95	9	

Variations de la respiration totale (RT), de la *respiration d'entretien* (RE), de la *respiration de croissance* (RT-RE), du *coefficient respiratoire de croissance* (λ) et du rapport RE/RT.

(1) en cm³ de CO₂ émis par colonie.

Les valeurs de λ les plus élevées sont généralement atteintes pendant la première semaine. Au début de la culture, le rendement de croissance est plus faible. Pendant cette même période, le glucose du milieu est rapidement absorbé et la teneur en glucides, principalement en saccharose, augmente. Il est très vraisemblable que cet enrichissement est suivi d'un surcroît d'oxydations, analogue à celui constaté chez des feuilles enrichies artificiellement en glucides. Ce surcroît d'oxydation n'est pas nécessairement lié à un besoin physiologique (MOYSE, 1950 b).

Les valeurs du *coefficient respiratoire de croissance* sont plus élevées pour les tissus de l'expérience utilisant l'ANA que pour les tissus de l'expérience utilisant le lait de Coco. La valeur plus élevée du rapport $\lambda = \frac{RT - RE}{\Delta Np}$ obtenue pour les premiers tissus

correspond, pendant les deux premières semaines, à une augmentation de l'activité respiratoire (RT plus grande, tableau XII) et pendant les 4 semaines suivantes à une diminution de la croissance (ΔNp plus petit, tableau X).

Dans l'expérience utilisant le lait de Coco, la comparaison des résultats obtenus pour le témoin et pour les deux lots traités ne montre pas de différences sensibles. L'exaltation de la croissance par le lait de Coco, et en particulier de la protéogenèse, ne s'accompagne pas d'une modification du rendement de croissance, contrairement à ce qui a été signalé à propos des fragments de racines.

Pour tous les lots de tissus, les rapports RE/RT (colonne 5 du tableau XV) augmentent au cours du temps. L'importance de la respiration d'entretien d'une colonie, par rapport à la respiration totale, est d'autant plus grande que cette colonie est plus volumineuse.

Une explication cohérente des variations de l'IRNp peut être formulée. Elle permet de distinguer la part qui revient à l'entretien et la part qui revient à la croissance. La valeur calculée du *coefficient respiratoire d'entretien* est de 0,107 cm³ de CO₂ par heure et par mg d'N protéique (page 71). Lorsque la masse des tissus contenant 1 mg d'N protéique oxyde en 1 heure une quantité d'aliment respiratoire représentée par X cm³ de CO₂ émis, ces X cm³ se décomposent ainsi :

0,107 cm³ qui correspondent à l'entretien

X — 0,107 cm³ qui correspondent à l'élaboration de nouvelles matières.

Or l'IRNp est élevée au début de la culture et atteint son maximum le 8^e jour. C'est à partir de ce moment que la synthèse de nouvelle matière tissulaire devient particulièrement grande par rapport à la quantité initiale de tissus. Ensuite, l'importance des synthèses, par rapport à la masse existante des tissus, devient

plus faible et l'IRNp diminue, bien qu'elle reste toujours supérieure à 0,107 cm³. J'avais supposé que l'action du lait de Coco sur la croissance était surtout sensible à la fin de la culture, alors que les échanges gazeux étaient plus exaltés au début (1955). Cette supposition s'est révélée inexacte. En fait la stimulation de la croissance est sensible dès le début de la culture et le maximum de l'activité respiratoire atteint le 8^e jour, pour les colonies cultivées en présence de lait de Coco, s'interprète clairement. Ce maximum est lié au fort accroissement d'N protéique en comparaison de la faible quantité des protéines initiales. Il est déterminé par la valeur du rapport des quantités de protéines nouvellement synthétisées aux protéines initialement présentes dans les tissus.

5^o *Conclusion. Métabolisme des tissus de Crown-gall de Scorsnère après leur repiquage sur un milieu neuf.*

a) *Métabolisme des témoins.* Les explantats de tissus de crown-gall, mis en présence d'un milieu neuf, absorbent rapidement les aliments tandis que leurs échanges respiratoires s'élèvent. Après une semaine, la teneur en glucides est plus grande. Le glucose absorbé et qui n'est pas dégradé est principalement converti en saccharose. Les synthèses sont rapides. La vitesse de la protéogénèse est légèrement plus grande que la vitesse des synthèses des autres constituants cellulaires. L'activité respiratoire du protoplasme augmente. Cette augmentation d'activité fournit de l'énergie utilisée à la formation des nouveaux tissus. Cependant, il semble qu'une petite fraction des oxydations, correspondant à l'afflux d'aliments respiratoires, libère de l'énergie qui n'est utilisée ni pour la croissance, ni pour l'entretien.

Pendant la deuxième semaine, la vitesse de la protéogénèse est plus rapide encore et toujours supérieure à celle des autres synthèses. La teneur en protéines devient ainsi très élevée. Les glucides sont toujours très abondants et le saccharose accumulé est transformé en glucosfructosanes. L'intensité respiratoire, exprimée par unité d'N protéique (IRNp) diminue, mais puisque la teneur des tissus en protéines augmente, l'intensité exprimée par g de substance sèche (IRs) reste constante. La diminution de l'IRNp accompagne, au cours du temps, la réduction de l'importance relative du protoplasme en néoformation par rapport à la masse protoplasmique préexistante.

Au cours de la seconde quinzaine, la protéogénèse se poursuit, mais avec une vitesse moins grande que la synthèse des autres constituants. Les nitrates apparaissent dans les tissus, l'aptitude à les réduire semble diminuer. La teneur en glucides solubles diminue aussi, les quantités des trois formes glucidiques, réducteurs libres, saccharose et glucosfructosanes s'égalisent. L'IRNp diminue

également, la respiration de croissance représente une part de plus en plus faible dans les oxydations respiratoires.

Pendant la troisième quinzaine, les phénomènes sont semblables. La teneur en substances membranaires augmente. L'activité respiratoire du protoplasme se stabilise, sa valeur est alors légèrement supérieure à celle qui correspond à une simple respiration d'entretien.

b) *Influence de l'acide α -naphtalène — acétique.* A la concentration de 10^{-3} , l'ANA n'exerce qu'une action très discrète sur les tissus de crown-gall. Pendant la dernière quinzaine, l'accumulation des nitrates est un peu plus prononcée que pour les témoins et la quantité de substances azotées solubles augmente peu.

A la concentration de 10^{-6} , l'ANA est légèrement toxique. La croissance des colonies est plus faible que celle des témoins. La protéogenèse est moins intense, il n'en est pas de même de la synthèse des substances inertes et en particulier des substances membranaires. La quantité de substances inertes atteint des valeurs égales aux valeurs obtenues avec les témoins. La diminution du pouvoir de réduction des nitrates est encore plus accentuée. L'accroissement des substances azotées solubles est très ralenti dès la seconde semaine. Cependant, la synthèse protéique se poursuit activement, elle ne semble pas dépendre directement de la teneur en substances azotées solubles qui devient très faible en fin d'expérience.

La présence d'ANA affecte peu les échanges gazeux. Dans tous les cas, les intensités respiratoires sont élevées, lorsque les quantités de protoplasme synthétisé sont importantes par rapport aux quantités préexistantes.

c) *Influence du lait de Coco.* La présence de lait de Coco stimule la protéogenèse des tissus de crown-gall. La stimulation est d'autant plus intense que la concentration en lait est plus élevée. La vitesse de la protéogenèse est particulièrement grande pendant la seconde semaine. La synthèse des substances azotées solubles est également très active. En présence de 10% de lait de Coco, les nitrates ne sont pas décelables dans les tissus. La croissance plus importante des colonies entraîne un accroissement corrélatif des autres constituants cellulaires, notamment des membranes.

Pendant la seconde semaine, les valeurs de l'IRNp sont plus élevées pour les tissus cultivés en présence de lait de Coco que pour les autres. C'est alors également que la quantité de protoplasme synthétisé est proportionnellement la plus importante par rapport à la quantité de protoplasme préexistant. L'importance des synthèses et l'élévation de l'activité respiratoire des tissus de crown-gall, cultivés en présence de lait de Coco, sont directement liés à la grandeur du prélèvement des aliments du milieu.

Il ne semble pas que le lait de Coco élève le rendement de croissance des crown-galls.

IV. — CONCLUSION. LA PHYSIOLOGIE DES FRAGMENTS DE TUBERCULE ET DES COLONIES DE CROWN-GALL, AU COURS DE LA CULTURE *IN VITRO*.

Les deux types de tissus étudiés, très différents dans leur nature, présentent pendant la culture *in vitro* un certain nombre de caractères communs. La succession des phénomènes physiologiques permet de distinguer plusieurs phases, caractérisées par un ou plusieurs faits dominants (protéogenèse, synthèse de constituants non protéiques, valeurs élevées ou faibles de l'intensité respiratoire).

— La première, ou « *phase de choc* », se déroule dans la période qui suit la fragmentation et la mise en contact des explantats avec un milieu neuf. Elle est caractérisée essentiellement par une augmentation de l'activité du protoplasme exprimée par l'IRNp. L'exaltation des oxydations respiratoires est vraisemblablement due beaucoup plus à l'afflux d'aliments carbonés provenant du milieu qu'aux traumatismes initiaux. Elle peut être comparée à l'accroissement semblable, constaté avec des feuilles artificiellement enrichies en glucides. Pendant cette phase, la protéogenèse peut commencer à se manifester, mais elle n'atteint pas sa vitesse maximum. Une partie de l'énergie libérée par les oxydations n'est alors certainement pas utilisée pour la croissance ou l'entretien. Cette phase est parfaitement visible pour les fragments de tubercule ; elle se déroule pendant les premières 24 heures qui suivent la mise en culture. Elle est moins nette avec les colonies de crown-gall. Cependant, au cours de la première semaine, les valeurs élevées du *coefficient respiratoire de croissance* montrent que l'influence du choc, tel qu'il a été défini plus haut, peut se manifester pendant cette période.

— La seconde phase est caractérisée par une protéogenèse rapide. Il s'agit d'une « *phase de jeunesse* » des tissus. Elle s'étend du 1^{er} jour de culture au huitième jour environ pour les fragments de tubercule. Elle dure jusqu'au quinzième environ pour les colonies de crown-gall. Dans le cas de ces dernières, les phénomènes dus au choc interfèrent avec elle pendant la première semaine, et la phase de jeunesse est mieux individualisée pendant la seconde semaine.

Au début de cette phase, l'activité respiratoire du protoplasme, traduite par l'IRNp, peut encore augmenter. Ensuite, la genèse des protéines qui n'interviennent pas directement dans les oxydations respiratoires doit être plus rapide que celle des « protéines

respiratoires » et l'IRNp diminue. Mais en raison de l'importance croissante de la masse protoplasmique par rapport à la masse totale des tissus, l'intensité respiratoire par g de tissu sec reste constante et peut même augmenter. Pendant cette période, le QR est toujours supérieur à 1, sa valeur est en relation avec l'importance de la protéogenèse. Les rendements de croissance les plus élevés sont obtenus pendant cette phase de jeunesse.

— La troisième phase peut être définie par l'équilibre qui se manifeste alors entre la protéogenèse et les synthèses des constituants du paraplasme. Les tissus ont atteint « l'état adulte ». Cette phase dure pendant la seconde semaine pour les fragments de tubercule et s'étend sur les 3^e, 4^e, 5^e et 6^e semaines pour les colonies de crown-gall. Les synthèses protéiques se poursuivent bien, mais avec une vitesse plus faible que dans la phase précédente. L'activité respiratoire est utilisée à l'entretien cellulaire. La formation rapide des composés inertes, conjuguée au ralentissement de la protéogenèse, est suivie d'une diminution de l'intensité respiratoire par g de tissu sec.

— La quatrième phase est une « phase de sénescence ». Elle débute dès la troisième semaine pour les fragments de tubercule. Avec les colonies de crown-gall, l'arrêt des expériences a eu lieu avant qu'elle ne se manifeste. Durant cette phase, la synthèse protéique se ralentit au point même de cesser. La synthèse des composés inertes, en particulier des substances membranaires, peut encore se poursuivre. Presque toute l'énergie respiratoire est utilisée à l'entretien des tissus. Les rendements de croissance sont extrêmement faibles. Au cours du temps, les exigences de l'entretien et de la croissance des tissus s'élèvent.

En fin de culture, deux faits peuvent donc expliquer la lenteur des synthèses.

1° L'appauvrissement du milieu en substances nutritives ne permet pas une alimentation aussi abondante que précédemment. (Les phénomènes de sénescence se manifestent plus tardivement dans les cultures faites en présence de lait de Coco qui apporte un supplément d'aliments non négligeable).

2° La plus grande taille des colonies ralentit également les échanges nutritifs. Les tissus sont dépourvus de systèmes conducteurs organisés. Les aliments et l'oxygène ont de plus en plus de difficultés à parvenir aux cellules situées au centre des colonies. Dans les colonies géantes de tissus végétaux réalisées par GAUTHERET (1945), seule la partie périphérique prolifère, le centre cesse rapidement de croître et même se nécrose. La fragmentation, lors des repiquages, ramène le volume tissulaire à une taille plus favorable à une croissance sensiblement homogène.

Ces 4 phases se déroulent en trois semaines pour les fragments de tubercule. Elles s'étendent sur une plus grande durée pour les colonies de crown-gall, puisque, après 6 semaines, la phase de sénescence n'est pas encore atteinte pour ces dernières (1).

L'ANA ne manifeste une action appréciable que vis-à-vis des fragments de tubercules. Aux concentrations moyennes, (10^{-7} , 10^{-6}), il prolonge la phase adulte d'équilibre. Cependant, en présence de ces concentrations, l'intensité des dégradations est fortement augmentée, les tissus néoformés semblent exiger plus d'énergie pour assurer leur entretien. Aux concentrations plus élevées (10^{-4} , 10^{-5}), les dégradations sont encore plus accélérées. Il en résulte un appauvrissement rapide des réserves glucidiques. La phase de sénescence est plus précoce, les tissus sont plus fragiles et meurent rapidement. La présence de l'auxine favorise l'utilisation rapide des glucides.

L'ANA n'a qu'une action très discrète sur le métabolisme des tissus de crown-gall. La concentration de 10^{-6} est légèrement toxique et ralentit la vitesse de la réduction des nitrates.

Pour les deux types de tissus étudiés, l'action du lait de Coco se manifeste essentiellement par une exaltation de la protéogenèse. Le lait de Coco accentue les caractéristiques de la phase de jeunesse. L'augmentation des échanges gazeux que l'on constate alors est due principalement à l'accroissement relativement plus rapide de la masse protoplasmique par rapport à l'augmentation de la masse totale des tissus.

L'hydrazide maléique inhibe les synthèses dès le début de la mise en culture. Elle inhibe également les dégradations, mais plus tardivement.

(1) Pour les colonies de crown-gall, d'après les résultats de LANCE (1957), la phase de sénescence serait atteinte entre le 70^{me} et 80^{me} jour.

CHAPITRE III

LES ACIDES AMINÉS DES TISSUS SAINS, DES TISSUS DE CROWN-GALL CULTIVÉS *IN VITRO* ET LEUR MÉTABOLISME

I. — LES DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS DES TISSUS SAINS, DES TISSUS DE CROWN-GALL ET DES TISSUS ACCOU- TUMÉS.

A. — MÉTHODES ET TECHNIQUES.

L'étude des acides aminés des tissus de Scorsonère, ainsi que de tissus de crown-gall de quelques autres espèces, est faite à l'aide des techniques classiques de chromatographie sur papier.

Les acides aminés libres, les acides aminés obtenus par hydrolyse des polypeptides et par hydrolyse des protéines sont analysés séparément.

Les solutions d'acides aminés sont débarrassées de divers substances (sels minéraux, acides, glucides) qui peuvent entraver le développement des chromatogrammes.

La méthode générale, dont la description suit, a été mise au point en collaboration avec Mlle M. L. CHAMPIGNY.

1° *Fixation. Séparation des différentes fractions.*

a) *Fixation, extraction des composés solubles.* Les tissus sont stabilisés dans l'alcool à 95° G.L. à l'ébullition, puis séchés et broyés. Les substances solubles sont extraites à trois reprises par de l'alcool à 50° G.L. également à l'ébullition.

Les extraits réunis sont concentrés par distillation sous pression réduite à une température inférieure à 40°C puis repris dans un faible volume d'eau. Cette liqueur renferme des acides aminés libres, des polypeptides, des glucides, des acides organiques libres ou salifiés et des sels minéraux.

b) *Séparation des acides aminés libres et des polypeptides.* Les acides aminés libres sont isolés des autres constituants en utilisant la résine cationique Permutite C 50, selon BOULANGER et BISERTE (1951).

La liqueur est versée très lentement (15 gouttes par minute) sur une colonne de résine préalablement activée par HCl 2N et rincée abondamment par de l'eau distillée. Les acides aminés, ainsi que les cations et les petits peptides sont retenus. Tous les autres constituants (glucides, acides organiques, polypeptides longs, etc...) sont entraînés dans le liquide effluent. Après passage de la solution la colonne est rincée par de l'eau distillée. Les eaux de rinçage jointes au liquide effluent constituent le *filtrat* 1 dont l'hydrolyse fournira les acides aminés des polypeptides.

Les acides aminés et les petits peptides sont déplacés par une solution d' NH_4OH N. L'éluat (*éluat* 1) est concentré sous pression réduite à une température inférieure à 40°C. Le résidu est repris dans un tube jaugé étroit et le volume ajusté à 1 ou 2 cm³.

La liqueur obtenue sert à l'analyse chromatographique des acides aminés libres.

c) *Hydrolyse des polypeptides.* Le filtrat 1 est divisé en 2 fractions qui sont concentrées jusqu'à dessiccation.

α) *hydrolyse acide* : le résidu sec provenant d'une des fractions est repris par 20 cm³ d'HCl 5 N, mis en tube scellé et laissé à l'étuve à 100°C pendant 24 heures.

L'hydrolysats est ensuite filtré sur verre fritté qui retient les humines. La majeure partie de HCl est éliminée par des distillations sous pression réduite répétées. L'HCl résiduel est enlevé par un passage sur permutite C 50. Les acides aminés retenus sont élués par NH_4OH . Le liquide effluent (*éluat* 2) est concentré et son volume est ajusté à 1 ou 2 cm³.

La liqueur obtenue est prête pour l'analyse chromatographique des acides aminés des polypeptides.

β) *hydrolyse alcaline* : le résidu sec provenant de la seconde fraction est repris par 20 cm³ de Na OH 5N, mis en tube scellé et laissé à l'étuve à 100°C pendant 48 heures.

L'hydrolysats est ensuite filtré, amené à un volume de 500 cm³ avec de l'eau et passé sur une colonne de résine cationique IRC 50 qui retient les ions Na^+ et les acides aminés basiques, mais ne retient pas les autres acides aminés (BRENNER et FREY, 1951). Le filtrat obtenu est débarrassé des différents produits résultant de l'hydrolyse alcaline par un dernier passage sur permutite C 50. Cette dernière retient les acides aminés qui sont élués comme précédemment. L'éluat concentré (*éluat* 3) et amené à un petit volume contient le *tryptophane des polypeptides*.

d) *Hydrolyse des protéines.* Le résidu insoluble après l'extraction est séché à l'étuve à 35°C pendant 24 heures, puis dans un dessiccateur sous vide en présence de P_2O_5 jusqu'à poids constant. Il est pesé et l'N total peut être dosé sur une partie aliquote. Le

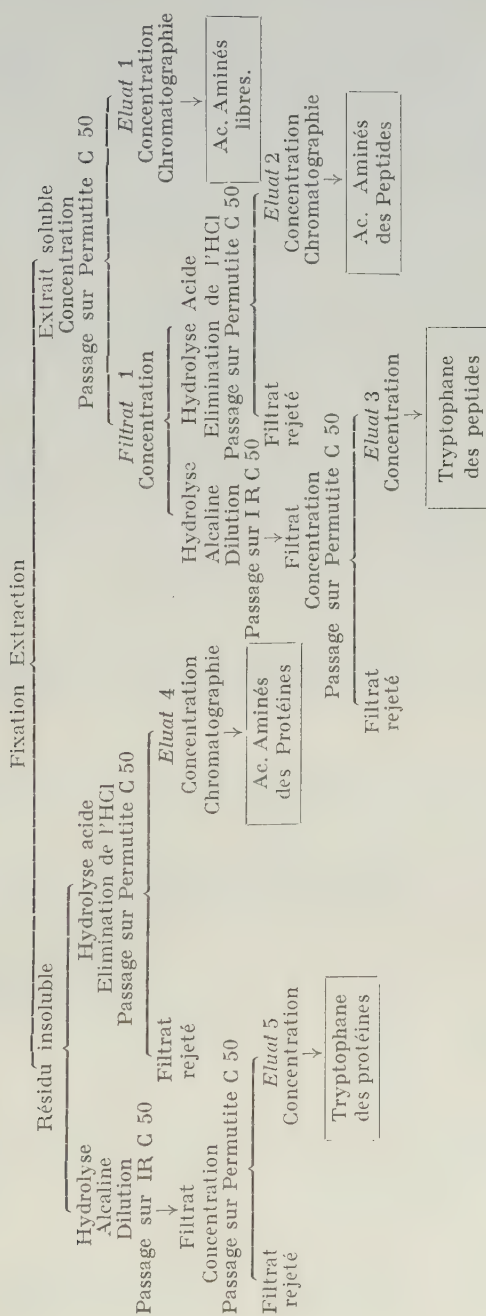


Fig. 4. — Schéma de la séparation des différents acides aminés.

reste est divisé en deux fractions. L'une est soumise à l'hydrolyse acide, l'autre à l'hydrolyse alcaline, comme il a été décrit à propos des polypeptides.

La majeure partie des acides aminés des protéines est obtenue après hydrolyse acide. Le tryptophane est recherché dans l'hydrolysât alcalin.

L'ensemble de ces techniques est résumé dans la figure 4.

2° Chromatographie sur papier.

Les solutions contenant les acides aminés sont soumises à la chromatographie bidimensionnelle en phase solvante descendante, sur papier Whatman n° 1 à 22°C (DENT, 1948).

Trois phases solvantes sont utilisées :

— en 1^{re} dimension,

— mélange solvant : phénol saturé d'eau ;

— mélange saturant l'atmosphère : eau saturée de phénol additionnée d'un peu de CNK pour éviter l'oxydation du phénol, et de 3% d' NH_4OH (pour favoriser la séparation des diacides et des acides aminés basiques).

— en 2^e dimension : deux types de solvants sont utilisés séparément :

— i) — mélange solvant : phase supérieure (après décantation) du mélange 2 — 4 — 6 collidine (1 vol), 2 — 4 lutidine (1 vol), eau (2 vol) ;

— mélange saturant l'atmosphère : phase inférieure du mélange précédent, additionnée de quelques gouttes de diéthylamine (pour favoriser la séparation de la phénylalanine).

— ii) — mélange solvant : phase supérieure du mélange n-butanol (4 vol), acide acétique (1 vol), eau (5 vol) ;

— mélange saturant l'atmosphère : phase inférieure du mélange précédent.

Tous les solvants organiques employés sont préalablement purifiés par distillation. Les mélanges sont décantés à la température à laquelle s'effectue la chromatographie.

Après développement, les chromatogrammes sont séchés à la température ambiante sous un fort courant d'air.

Les acides aminés sont révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1% dans le butanol. Les taches colorées correspondant aux différents acides aminés apparaissent progressivement, lorsque l'on chauffe doucement le chromatogramme à l'aide d'un courant d'air chaud. L'apparition progressive de la coloration permet de distinguer des taches contiguës qui peuvent se confondre lorsque la coloration atteint son maximum.

3° *Identification des acides aminés.*

Les différents acides aminés sont identifiés :

— par leur Rf dans les différents solvants.

— par la couleur obtenue avec la nihydrine. Les différences de teinte sont particulièrement sensibles lorsqu'on emploie le mélange collidine — lutidine comme second solvant.

— par cochromatographie avec des acides aminés témoins.

— par certaines réactions colorées spécifiques.

L'arginine est identifiée à l'aide du réactif de SAKAGUCHI selon ACHER et CROCKER (1952); l'histidine par la réaction de PAULY modifiée par SANGER et TUPPY (1951); le tryptophane à l'aide du réactif d'EHRlich selon TABONE, ROBERT, THOMASSEY et MAMOUNAS (1950); la méthionine par le réactif à l'iodoplatinate de TOENNIES et KOLB (1951), la cystéine après oxydation en acide cystéique par l'eau oxygénée (DENT, 1948).

La leucine et l'isoleucine n'ont pas été séparées.

TABLEAU XVI

Tissus normaux et tumoraux de Scorsonère.

	Tissus normaux		Tissus tumoraux
	en culture pour la première fois	après plusieurs repiquages	
N de la fraction protéique (1).....	0,97	0,88	0,85
N de la fraction peptidique (1)	0,02	0,015	0,015
N de la fraction des acides aminés libres (1)	1,29	1,12	0,35
N de la glutamine (2).	0,03	0,015	0,02
N de l'asparagine (2)..	0,95	0,87	0,03
N α -aminé (3).....	0,21	0,18	0,20

Teneurs en différentes formes d'azote en mg d'N pour 100 mg de substance sèche.

(1) Dosé selon Kjeldahl.

(2) Dosé selon Moyse (1950).

(3) Dosé selon Van Slyke, Mac Fayden et Hamilton (1941).

4° Dosages des amides et de l'azote aminé.

Dans certains cas, les dosages de l'N amidé total, de l'N amidé de la glutamine et de l'N aminé ont été pratiqués sur des parties aliquotes de la fraction contenant les acides aminés libres.

a) l'N amidé total est déterminé après hydrolyse en présence d'acide sulfurique 2 N pendant 3 heures à 100°C. La liqueur est amenée à un pH inférieur, mais voisin de 7 à l'aide de soude et portée dans un appareil de YOVANOVITCH. L' NH_3 , déplacé après alcalinisation, est distillé, recueilli dans un excès d'acide borique et dosé par $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}/35$.

b) l'N amidé de la glutamine est déterminé après hydrolyse en présence d'un tampon phosphate de pH 6,5, pendant 2 heures à 100°C, NH_3 est dosé comme précédemment (voir MOYSE, 1950a).

c) l'N α -aminé est dosé par la méthode de VAN SLYKE, Mac FAYDEN et HAMILTON (1941). Le CO_2 produit par l'action de la ninhydrine sur les acides aminés, est recueilli dans une solution de baryte 0,3 N. L'excès de baryte est dosé en retour par $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}/35$.

D'après les résultats obtenus, on peut déduire :

N amidé de l'asparagine = N amidé total — N amidé de la glutamine,

N total des amides = $2 \times$ N amidé total,

N α aminé des acides aminés = N α aminé — N amidé total.

B. — RÉSULTATS.

1° Les acides aminés des tissus sains et des tissus de crown-gall de Scorsonère.

La recherche des acides aminés a été faite dans les trois types de tissus suivants :

a — tissus de xylème de tubercules de Scorsonère, après trois semaines de culture *in vitro* sur un milieu contenant 10^{-7} d'ANA ;

b — tissus de même nature, en culture depuis 13 mois, ayant subi 5 repiquages et prélevés 1 mois après le dernier repiquage ;

c — tissus de crown-gall de Scorsonère, provenant de la souche isolée par GAUTHERET (1948) et prélevés 6 semaines après le dernier repiquage.

Les teneurs en différentes formes d'azote de ces tissus figurent au tableau XVI.

Les résultats montrent que la prolongation de la culture *in vitro* a peu d'influence sur la composition azotée des tissus normaux de Scorsonère. Ils soulignent leur très forte teneur en asparagine. L'abondance de l'asparagine est extrêmement gênante

pour l'obtention de bons chromatogrammes. En profitant de sa faible solubilité dans l'eau, la majeure partie de cette amide est éliminée après sa cristallisation dans la solution concentrée des acides aminés. La chromatographie sur papier est faite à partir de la solution décantée à laquelle sont ajoutées les eaux de lavage des cristaux.

Les différents acides aminés figurent dans le tableau XVII.

TABLEAU XVII

Tissus normaux et tumoraux de Scorsonère.

	Acides aminés libres		Acides aminés de la fraction peptidique		Acides aminés des protéines	
	sains	tumoraux	sains	tumoraux	sains	tumoraux
Acide aspartique...	+	+	+	+	+	+
Acide glutamique...	+	+	+	+	+	+
Sérine	+	+	+	+	+	+
Glycocolle	+	+	+	+	+	+
Thréonine	+	+	+	+	+	+
α Alanine	+	+	+	+	+	+
β Alanine	+	—	+	+	—	—
Valine	+	+	+	+	+	+
Leucines	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+	+	+
Hydroxyproline ...	—	—	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+
Phénylalanine	+	+	+	+	+	+
Tryptophane	+	—	—	—	+	+
Histidine	Traces	Traces	+	+	+	+
Cystéine	—	—	Traces	Traces	+	+
Méthionine	—	—	—	—	+	+
Ac. γ aminobutyrique	+	+	—	—	—	—
Asparagine	++++	+	—	—	—	—
Glutamine	+	+	—	—	—	—
Inconnu A	+	+	—	—	—	—
Inconnu B	—	+++	—	—	—	—

Composition en acides aminés des tissus.

Le nombre des signes + est fonction de la surface de la tache et de l'intensité de la coloration.

a) *Les acides aminés des tissus normaux.* La prolongation de la culture et les différents repiquages n'ont pas modifié la composition des tissus normaux. Les chromatogrammes obtenus avec chaque lot sont identiques.

— Les acides mis en évidence sont très communs, à l'exception de l'un d'entre eux, non identifié l'*inconnu A*. Cet acide, présent en faible quantité, réagit avec la ninhydrine et est défini par les RF suivants : 0,32 avec le phénol ammoniacal, 0,10 avec le mélange collidine — lutidine.

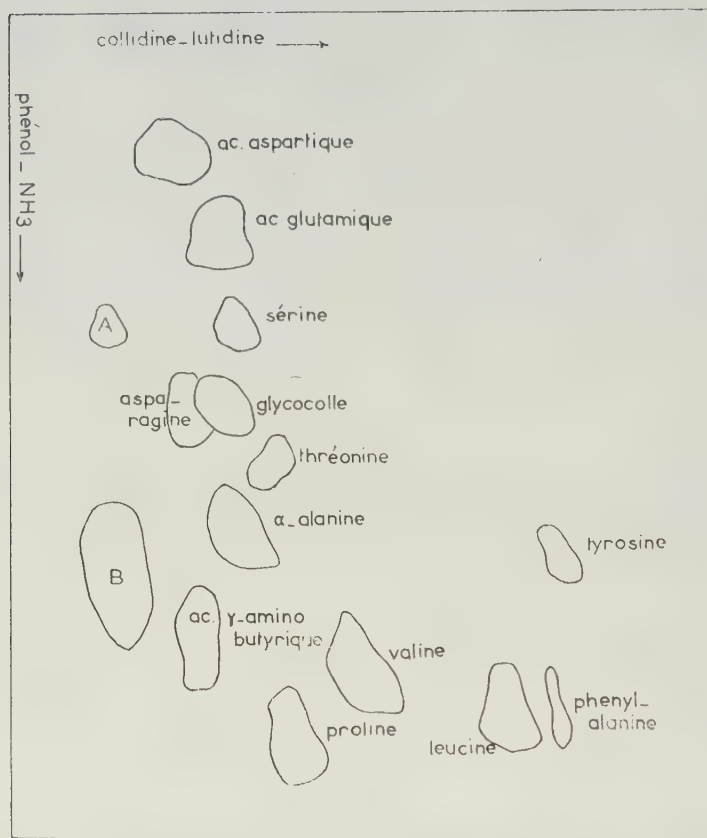


Fig. 5. — Chromatogramme des acides aminés libres des tissus de Crown-gall de Scorsonère (origine : en haut et à gauche).

— L'hydroxyproline et la cystéine ne sont pas décelables parmi les acides aminés libres, mais ces substances existent à l'état combiné dans les peptides et les protéines. La méthionine n'est mise en évidence que dans les hydrolysats protéiques. Ces trois acides aminés, s'ils se trouvent à l'état libre, n'existent alors qu'en très faible quantité. Ce fait est très fréquemment observé chez les végétaux (STEWART, ZACHARIUS et POLLARD, 1955).

— La présence d'acide γ -aminobutyrique parmi les acides aminés libres est très générale (STEWART, THOMPSON et DENT, 1949 ; SYNGE, 1951). Cet acide ne se retrouve jamais dans les hydrolysats protéiques.

— La β -alanine est présente parmi les acides aminés libres. Cette présence n'est pas absolument générale, mais très fréquente dans les extraits des tissus végétaux (STEWART, ZACHARIUS et POLLARD, 1955). Par contre, l'existence de β -alanine incorporée dans les polypeptides est générale (CHAMPIGNY et LIORET, 1955).

b) *Les acides aminés des tissus de crown-gall* (fig. 5). Les hydrolysats protéiques et peptidiques des tissus tumoraux renferment les mêmes acides aminés que les hydrolysats des tissus normaux.

Cette similitude ne se poursuit pas avec la fraction des acides aminés libres, à propos de laquelle des différences importantes se manifestent. Les tissus de crown-gall sont en effet beaucoup moins riches en asparagine. Le tryptophane et la β -alanine ne sont pas décelables. Enfin les tissus tumoraux possèdent une substance inconnue nouvelle, non identifiée, l'*inconnu B*. Cette substance forme en présence de ninhydrine une très large tache violette définie par les Rf suivants :

0,62 avec le phénol ammoniacal,

0,05 avec le butanol acétique,

0,10 avec la collidine-lutidine.

— Pour préciser si ces différences ont un caractère de généralité propre aux tumeurs, l'analyse des acides aminés de tissus de crown-galls appartenant à d'autres espèces végétales a été faite.

2° *Les acides aminés des tissus de crown-galls de diverses espèces.*

Trois souches de tissus tumoraux isolés par GAUTHERET et MOREL ont été analysées. Ces souches appartiennent aux espèces suivantes : *Helianthus tuberosus* L, *Nicotiana Tabacum* L, et *Parthenocissus tricuspidata* Planchon.

La composition en acides aminés des fractions peptidiques et protéiques ne diffère pas de celle des tissus analysés précédemment.

La β -alanine est présente dans ces tissus. Son absence des tissus de crown-gall de Scorsonère n'est donc pas en liaison avec leur caractère tumoral.

Comme dans le crown-gall de Scorsonère, le tryptophane n'est pas décelable et l'asparagine est en faible quantité.

Enfin l'*inconnu B* est présent dans les trois tissus étudiés. En classant les différentes taches d'après leurs surfaces et l'intensité de leur coloration on constate que la tache correspondant à l'*inconnu B* est la plus importante pour les tissus de Topinambour. elle vient en seconde position pour les tissus de Tabac (après l'acide

γ -aminobutyrique). Si l'*inconnu B* se trouve en grande quantité dans les tissus tumoraux de ces deux espèces, les crown-galls de Vigne-vierge en contiennent par contre un peu moins. La présence de ce corps peut être considérée comme une caractéristique des tissus de crown-galls cultivés *in vitro*.

3° *Les acides aminés des tissus accoutumés de Scorsonère.*

GAUTHERET a qualifié d'accoutumés (1942 b), puis d'anergisés (1955), les tissus normaux qui, primitivement incapables de proliférer en l'absence d'auxine dans le milieu de culture, acquièrent, après plusieurs passages sur des milieux contenant des substances de croissance, la capacité de se développer sans addition de ces substances. Ces tissus possèdent alors des propriétés qui les rapprochent des tissus tumoraux. Greffés, ils induisent des tumeurs qui rappellent les crown-galls (CAMUS et GAUTHERET, 1948 ; BRAUN et MOREL, 1950).

La composition en acides aminés des tissus accoutumés de Scorsonère est presque identique à celle des tissus normaux de la même espèce. La seule différence porte sur l'asparagine qui est présente en quantité moyenne.

Les tissus accoutumés contiennent du tryptophane comme les tissus normaux. L'*inconnu B* n'y est pas décelable. Ils sont donc très différents des crown-galls.

C. — DISCUSSION.

Les principales différences observées dans la composition en acides aminés des tissus étudiés portent essentiellement sur trois points :

- 1° Teneur en asparagine,
- 2° Présence ou absence de tryptophane,
- 3° Présence ou absence de l'*inconnu B*.

— La grande quantité d'asparagine trouvée dans les tissus normaux doit être une caractéristique propre aux tissus sains de tubercules de Scorsonère pour lesquels cette amide représente une forme d'accumulation de l'azote. De même, l'arginine représente la forme d'accumulation de l'azote dans les tubercules de Topinambour (DURANTON, 1956). L'asparagine ne constitue pas une réserve très mobile, l'étude du métabolisme des fragments de tubercules de Scorsonère en culture *in vitro* a montré les faibles variations de l'N soluble. De plus, après plusieurs repiquages successifs, les tissus ont la même teneur en asparagine. Il n'en est pas de même pour l'arginine des tissus de tubercules de Topinambour, dont la quantité diminue très rapidement dès que ces derniers sont mis en culture.

— L'impossibilité de mettre en évidence le tryptophane à l'état libre dans les extraits de tissus tumoraux, opposés à la possibilité de caractériser cet acide aminé dans les extraits de tissus normaux, confirme les résultats de HENDERSON et BONNER (1952). Ces auteurs admettent que la synthèse de l'acide indolacétique se fait par oxydation du tryptophane, la réaction étant catalysée par un enzyme mis en évidence par WILDMAN, FERRI et BONNER (1947). Dans les tissus de crown-gall, très riches en auxine, le tryptophane libre serait rapidement converti en acide indolacétique. Au contraire dans les tissus normaux, pauvres en auxine, cette transformation serait alors lente. Elle n'est cependant pas nulle, puisque KULESCHA (1951) a montré la possibilité de la synthèse de l'auxine par des tissus sains de Topinambour alimentés en tryptophane. Dans les tissus accoutumés, on peut déceler du tryptophane libre et de fortes quantités d'auxines.

Si l'hypothèse d'HENDERSON et BONNER peut être admise, la transformation du tryptophane libre est cependant loin d'être complète.

— Enfin, la présence de la substance *inconnue B* paraît être une caractéristique des tissus de crown-galls cultivés *in vitro*, quelle que soit l'espèce à laquelle ils appartiennent (LIORET, 1956, 1957 a).

La présence de l'*inconnu B* a-t-elle un rapport direct avec le haut pouvoir de prolifération des tissus de crown-galls ?

Son accumulation correspond-elle à l'existence d'enzymes particuliers assurant la synthèse de ce corps qui serait réellement spécifique à ces tissus ? Ou bien s'agit-il d'une substance qui existerait, mais seulement à l'état de traces, dans les tissus sains capables de la transformer rapidement, alors que les tissus tumoraux seraient dépourvus des enzymes assurant les transformations possibles ? Les éléments actuels ne permettent pas de répondre à ces questions. De nouvelles recherches devront être faites à ce propos. L'étude des modalités de l'utilisation de l'acide glutamique radioactif par les tissus de crown-gall constitue un premier essai pour connaître la genèse de l'*inconnu B*.

II. — L'ISOLEMENT ET LES PROPRIÉTÉS DU COMPOSÉ PARTICULIER AUX TISSUS DE CROWN-GALLS (*INCONNU B*).

A. — ISOLEMENT.

Le corps *inconnu B* particulier aux tissus de crown-galls a été isolé par chromatographie sur colonne de poudre de cellulose et sur papier Whatman n° 3 MM.

1° Séparation par chromatographie sur poudre de cellulose.

1) *Premier essai.* Un premier essai a porté sur 91 colonies de crown-gall de Scorsonère, représentant 150 g de tissus frais.

Les tissus sont fixés dans l'alcool bouillant et soumis à une extraction hydroalcoolique. Après élimination de l'alcool, l'extrait soluble est versé sur une colonne de Permutite C₆₀. Les acides aminés retenus par la résine sont ensuite élués par NH₄OH (N) dont l'excès est éliminé par distillation. La solution aqueuse concentrée contenant les acides aminés est fortement colorée en brun foncé. La coloration est éliminée par adsorption sur 100 mg de charbon actif après 3 minutes d'ébullition. Les acides aminés aromatiques sont également fixés sur le charbon. Une filtration suivie de rinçages permet d'obtenir une liqueur limpide contenant les acides aminés aliphatiques parmi lesquels on décèle l'*inconnu B*.

Le liquide est évaporé, le résidu sec est repris par 1 ou 2 cm³ d'eau saturée de butanol.

Une colonne est préparée en mélangeant de la poudre de cellulose Whatman « Standard grade » avec du butanol acétique saturé d'eau (phase supérieure du mélange butanol = 8 vol. ; ac. acétique = 1 vol. ; eau = 10 vol.) (SYNGE, 1951).

La bouillie liquide obtenue est versée lentement dans une colonne de verre de 9 mm de diamètre sur 40 cm de hauteur. La cellulose se dépose. On prend soin de la laisser toujours immergée. On constitue ainsi une colonne de 30 cm de haut, qui est ensuite rincée par 100 cm³ de butanol acétique s'écoulant à la vitesse de 0,5 cm³ par minute. Une surpression de 20 mm Hg est nécessaire pour obtenir cette vitesse d'écoulement.

La solution contenant les acides aminés est versée au sommet de la colonne. On laisse le solvant s'écouler toujours en présence de la même pression. L'effluent est recueilli par fractions de 10 cm³ à l'aide d'un collecteur automatique. Quatre cent cinquante cm³ de solvant sont utilisés, fournissant 45 fractions. Le solvant est éliminé sous un fort courant d'air. Chaque fraction est reprise par l'eau et amenée à un volume de 1 cm³. Cent mm³ sont utilisés pour identifier les acides aminés présents, par chromatographie sur papier unidimensionnelle avec le phénol ammoniacal. La majeure partie des acides aminés est éluee dans l'effluent des fractions 3 à 23. Les leucines, la valine et la proline sortent au début, les acides aminés basiques à la fin. L'*inconnu B* apparaît à la 21^e fraction et est trouvé dans toutes celles qui suivent. La lysine est décelable jusque dans la fraction 27.

Les fractions 30 à 45 sont réunies, concentrées en un volume de 5 cm³. La chromatographie bidimensionnelle de cette dernière solution ne permet de révéler qu'une seule tache ; celle correspondant à l'*inconnu B*.

b) *Essais ultérieurs.* Trois autres essais ont été faits en suivant la même méthode d'isolement. Ils portent sur des poids de tissus frais compris entre 700 et 1.800 g. Une colonne de poudre de cellulose de 3 cm de diamètre sur 55 cm de hauteur est alors utilisée. Cette colonne est préalablement rincée par 500 cm³ de butanol acétique. La quantité de solvant nécessaire au développement proprement dit, qui dure près de 80 heures, est de 2.400 cm³. Quatre vingt fractions de 30 cm³ sont recueillies.

Un dixième de cm³ de chaque fraction est utilisée pour vérifier la présence d'acides aminés, à l'aide de ninhydrine. L'analyse chromatographique n'est faite que sur les fractions terminales qui réagissent positivement. Les fractions contenant l'*inconnu B* sont réunies et concentrées. L'absence d'autres acides aminés est vérifiée par chromatographie bidimensionnelle.

Après concentration, l'*inconnu B* est précipité de sa solution aqueuse par l'alcool à 95°G.L., ce qui permet de le purifier. Les eaux mères sont rejetées, le précipité est lavé à l'alcool et à l'éther. Il est redissous dans l'eau, et après plusieurs précipitations successives, il cristallise sous la forme d'aiguilles incolores.

2° Séparation par chromatographie sur papier.

Les résultats obtenus avec la poudre de cellulose ne sont pas constants. Dans certains cas les acides aminés les moins solubles dans le butanol (ac. aspartique, lysine, histidine et l'asparagine) sont élués avec l'*inconnu B*. Il est nécessaire d'éliminer ces corps par une nouvelle chromatographie. Le papier épais Whatman 3 MM est alors utilisé comme support.

Les feuilles sont préalablement lavées en laissant s'écouler par capillarité plusieurs litres d'eau distillée (1), puis elles sont séchées. La solution contenant la substance à isoler et les impuretés est étalée en une mince ligne sur toute la longueur des feuilles. Le développement est réalisé avec le mélange collidine-lutidine. L'*inconnu B* est repéré en révélant de petites régions des chromatogrammes. Les bandes correspondantes sont découpées, puis éluées par de l'eau distillée.

L'inconstance des résultats de la chromatographie sur colonne de cellulose, et la longueur des manipulations qu'elle comprend, m'ont fait abandonner complètement cette technique.

Plusieurs chromatographies successives sur papier épais permettent d'obtenir des résultats comparables. Une première avec le butanol acétique donne une séparation grossière. Une seconde avec la collidine-lutidine permet d'éliminer la majeure partie

(1) Le papier contient un certain nombre d'impuretés hydrosolubles dont des peptides, qui se trouveraient élués avec la substance recherchée. Il est absolument nécessaire de les éliminer (WYNN, 1949).

des acides aminés basiques et des diacides. Une troisième, utilisant de nouveau le butanol acétique, fournit un produit donnant une seule tache. La purification se termine par cristallisation dans l'alcool aqueux.

Ainsi, à partir d'environ 350 cultures représentant 1 kg de tissus frais, et avec l'aide de 3 séries de 10 chromatogrammes simultanés, il est possible d'obtenir plus de 100 mg de produit cristallisé.

Au total, 2.544 colonies correspondant à 8.200 g de tissus frais de crown-gall de Scorsonère et 627 colonies correspondant à 877 g de tissus de crown-gall de Tabac ont été traitées ainsi. Deux essais ont utilisé des colonnes de poudre de cellulose, un essai a utilisé à la fois la colonne et le papier, les deux derniers, dont celui portant sur le tissu de Tabac, ont utilisé simplement le papier épais.

B. — PROPRIÉTÉS DE L'*Inconnu B*.

Le point de fusion des cristaux obtenus est compris entre 157° et 160°. Le corps se décompose à 240°C avec dégagement gazeux (microscope à point de fusion Reichert). Les aiguilles sont très solubles dans l'eau et les solutions acides ou alcalines. Elles sont très peu solubles dans le méthanol et insolubles dans l'éthanol et les divers solvants organiques.

1° *Recherche d'une formule brute*. L'analyse élémentaire des cristaux lavés à l'alcool et desséchés sous vide pendant quelques heures à 50°C a fourni les résultats suivants :

C : 41,09 %	H : 9,00 %	N : 10,19 %
41,35 %	8,32 %	10,50 %
42,00 %	8,86 %	

L'absence de soufre, de phosphore et d'halogènes a été vérifiée.

La formule brute qui se rapproche le plus de ces pourcentages serait : $C_{10}H_{21}O.N_2$. Cette formule correspond aux rapports pondéraux suivants : C = 42,23 ; H = 8,50 ; N = 9,88. Une telle formule montre l'existence de plusieurs molécules d'eau de cristallisation.

Après dessiccation prolongée à 100°C sous vide, on obtient :

C : 48,61 %	H : 8,72 %	N : 12,55	O : 30,66
48,35 %	8,99 %		(par différence)
48,50 %	8,64 %		
48,34 %	8,45 %		

Le dosage direct d'oxygène a donné : 34,01 et 33,88 %, ce qui confirme bien l'absence de S, P et d'halogènes.

Les formules brutes se rapprochant le plus de ces pourcentages sont :

a) $C_{20}H_{10}O_5N_2$ avec C : 48,37 ; H : 8,12 ; N : 11,28 ; O : 32,23.

La proportion théorique d'hydrogène est alors beaucoup plus faible que la proportion trouvée, et la proportion théorique d'oxygène est trop élevée.

b) $C_9H_{18}O_4N_2$ avec C : 49,50 ; H : 8,30 ; N : 12,87 ; O : 29,33.

La proportion théorique de carbone est alors trop élevée et la proportion d'oxygène trop faible.

Malgré plusieurs essais, il n'a pas été possible d'obtenir des résultats permettant l'établissement d'une formule brute satisfaisante. J. ASSELINEAU a synthétisé des dérivés acétylés et méthylés du produit, dont les analyses se sont également révélées difficilement interprétables (1).

2° Propriétés.

J'ai réalisé différents essais qui ont abouti aux résultats suivants :

1° Le produit conserve ses propriétés (Rf, point de fusion) après avoir été soumis à l'action d'HCl 6 N à 100°C pendant 24 heures. Il ne peut donc s'agir d'une amide ou d'un peptide.

2° Il ne réduit pas le NO_3Ag ammoniacal, donc ne possède pas de propriétés réductrices.

3° Il n'est pas fixé par la Déacidite A 200 qui retient les diacides aminés (BOULANGER et BISERTE, 1951), ni par la résine IRC 50 qui retient les acides aminés basiques (BRENNER et FREY, 1951). De plus, aucune migration n'est constatée lorsqu'il est soumis à l'électrophorèse sur papier en présence d'un tampon pH 8,4 au véronal sodique, sous 300 volts, 10 milliampères. Il possède donc autant de fonctions basiques que de fonctions acides.

4° Le dosage de l'N aminé par dégagement d'N gazeux après réaction avec l'acide nitreux (VAN SLYKE, 1929) donne 5,1% d'N aminé. Par rapport aux analyses élémentaires, cette valeur montre que la moitié seulement de l'N serait sous forme aminée.

5° Le produit, chromatographié en présence de CO_3Cu (CRUMPLER et DENT, 1949), ne paraît pas former de complexe avec le cuivre. De plus, aucun dégagement de CO_2 ne peut être mis en évidence, lorsque l'on fait réagir la ninhydrine selon VAN SLYKE, Mac FAYDEN et HAMILTON (1941). Aucune fonction NH_2 n'est située en α par rapport aux carboxyles.

De plus, les propriétés suivantes ont été mises en évidence par J. ASSELINEAU (1) :

1° Le produit ne réagit pas avec l'acide periodique selon GORDON, THORNBURG et WERUM (1956). Il n'existe pas de fonction hydroxyle proche de fonction aminée.

(1) Communication personnelle.

2° Il ne contient ni groupe (O) — CH₃ ni groupe (N) — CH₃.

3° Le dosage des groupes C-méthyles, par oxydation chromique selon KUHN et ROTH (1933) donne 5,49% (en — CH₃). Cette valeur correspond à 1 seul groupe méthyle pour une formule en C₁₀ ou en C₉ (6% théorique avec C₁₀H₂₀O₅N₂).

4° L'oxydation chromique ménagée selon GARBERS, SCHMID et KARRER (1954) ne fournit que de l'acide acétique. Le groupe méthyle est donc simplement substitué sur la chaîne principale (1).

III. — LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE GLUTAMIQUE DANS LES TISSUS DE CROWN-GALL DE SCORSONÈRE

Dans le but d'étudier la genèse des acides aminés et en particulier de l'*inconnu B* dans les tissus de crown-gall, j'ai recherché quelles sont les substances radioactives présentes dans ces tissus après l'absorption d'acide glutamique marqué par ¹⁴C soit en 3 et 4, soit en 1 et qui possède, dans les deux cas, la même activité spécifique par molécule-gramme.

L'acide glutamique a été choisi en raison de la situation qu'il occupe dans le métabolisme intermédiaire. VIRTANEN (1955) admet que sa synthèse par condensation de l'ion ammonium avec l'acide α-cétoglutarique est l'étape principale de l'intégration de l'N minéral dans les molécules organiques.

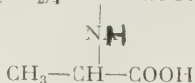
Inversement, la perte de son groupe aminé, par transamination ou désamination, produit l'acide α-cétoglutarique qui peut fournir par l'intermédiaire des réactions du cycle de Krebs, des chaînons carbonés à de nombreux métabolites. Par ses relations avec l'acide α-cétoglutarique d'une part et avec la glutamine d'autre part, l'acide glutamique est étroitement lié aux oxydations respiratoires.

A. — MÉTHODES ET TECHNIQUES.

1° *Expériences.*

Les expériences portent sur des colonies tissulaires âgées de 20 jours. A ce moment, les tissus sont jeunes, en pleine croissance. De plus, les variations physiologiques provoquées par le repiquage sont atténuées.

(1) La structure a été déterminée en cours d'édition. Il s'agit d'un acide aminé de formule H₂N—(CH₂)₄—CH—COOH qui a reçu le nom de *lysopine*.



Deux lots de 24 colonies sont prélevés, débarrassés de la gélose du milieu et pesés. Chaque lot est introduit dans une fiole de Fourneau contenant 4 cm³ de solution de Knop diluée de moitié, 200 mg de glucose et 7,35 mg d'acide glutamique marqué d'activité spécifique égale à 1 curie/mole. La radioactivité de l'acide glutamique ajouté est donc de 50 microcuries. L'acide glutamique utilisé pour le premier lot est marqué en 3 et 4 ($\text{HOOC} - {}^{14}\text{CH}_2 - {}^{14}\text{CH}_2 - \text{CHNH}_2 - \text{COOH}$), celui utilisé pour le second l'est en 1 ($\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CHNH}_2 - {}^{14}\text{COOH}$). Toutes les opérations sont faites aseptiquement. Les concentrations en glucose et en minéraux sont celles des milieux sur lesquels les tissus sont habituellement maintenus. Les cellules sont ainsi bien approvisionnées en glucides et l'acide glutamique introduit n'offre qu'un apport négligeable de carbone.

Les colonies, dont la hauteur moyenne dépasse légèrement 0,5 cm, ne sont immergées que sur 2 mm dans la solution contenant la substance radioactive. Les fioles sont placées dans des dessiccateurs. Au fond de chaque dessiccateur est disposée une solution de potasse à 5%, elle est destinée à absorber le CO₂ qui peut se dégager. Les cultures sont laissées ainsi pendant 4 heures en contact avec la solution. La température est de 20°C. On agite légèrement tous les quarts d'heure.

2° Analyses.

Après 4 heures, les colonies sont retirées du milieu, rincées 10 fois et essorées sur Büchner afin d'éliminer l'acide glutamique restant à la surface des tissus. Elles sont fixées dans l'alcool à 95°G.L. à l'ébullition, puis les substances solubles sont extraites selon la technique décrite dans les chapitres précédents.

Les radioactivités de l'extrait soluble et du résidu insoluble sont déterminées à l'aide d'un compteur de GEIGER à fenêtre de mica mince (1,8 mg par cm₂).

L'extrait soluble est partagé en trois fractions par passages successifs sur une série de colonnes de résines échangeurs d'ions (JOLCHINE, 1956).

1° La fraction basique, contenant les acides aminés libres, est retenue par la Permutite C₂₀. Elle est ensuite éluée par NH₄OH N. L'ammoniaque est éliminée par distillation.

2° La fraction acide, contenant les acides organiques et les composés phosphorylés, est retenue par la résine anionique Duolite A₆ et éluée par NaOH N. Le sodium des sels obtenus est éliminé par un nouveau passage sur Permutite C₂₀.

3° La fraction neutre, qui contient principalement les glucides et les peptides, a été recueillie lors du passage de l'extrait sur la résine anionique, avant l'éluion des acides organiques ou plutôt de leurs sels.

La radioactivité de chaque fraction est mesurée.

Les acides aminés sont séparés par chromatographie sur papier selon les techniques décrites précédemment.

Les acides organiques sont également séparés par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 1 avec les mélanges solvants suivants :

1° Alcool 95°G.L. : 80 cm³ ; NH₄OH 25°Bé : 5 cm³ ; H₂O : 15 cm³, ou bien phénol saturé d'eau, pour la première dimension.

2° Butanol : 100 cm³ ; acide formique : 24 cm³ ; H₂O : 12 cm³, pour la deuxième dimension.

Les substances radioactives sont décelées par autoradiographie.

Leurs emplacements sont délimités sur les chromatogrammes et les morceaux de papier correspondants découpés.

Les substances sont alors éluées selon deux procédés différents. Le premier consiste à les entraîner par un courant d'eau se déplaçant par capillarité le long du papier ; il a été utilisé pour l'élution des substances radioactives obtenues après assimilation d'acide glutamique 3 — 4 ¹⁴C. Le second consiste à entraîner directement les substances par l'eau tiède, après avoir haché le papier en petits morceaux ; il a été employé pour l'élution des produits obtenus après assimilation d'acide glutamique 1¹⁴C. Les deux procédés sont équivalents.

La radioactivité des substances éluées est mesurée.

Les acides aminés sont identifiés comme il a été indiqué précédemment.

Les acides organiques sont identifiés par leur R_f dans les différents solvants, par cochromatographie avec des acides connus et par les différentes couleurs obtenues après révélation à l'aide du nitrate d'argent ammoniacal.

L'identification de l'acide pyrrolidone-carboxylique a nécessité sa préparation qui est faite par traitement de la glutamine en solution aqueuse à l'ébullition pendant deux heures, en présence d'un tampon phosphate de pH 6,2 (*cf.* WAELSCH, 1952). On obtient ainsi un composé acide, soluble dans l'éther, donnant une réaction positive au test de RYDON et SMITH (1952) et ayant les mêmes R_f que l'acide pyrrolidone-carboxylique (NORDMANN et coll., 1954).

La réalisation des 2-4 dinitrophénylhydrazones des corps cétoniques contenus dans la fraction acide, selon JOLCHINE (1956), et la comparaison des composés obtenus avec les 2-4 dinitrophénylhydrazones de divers acides cétoniques, ont permis de mettre en évidence la présence d'acide α -cétoglutarique radioactif dans les tissus expérimentés.

B. — RÉSULTATS.

Le tableau XVIII donne la radioactivité des milieux avant et après les expériences, la radioactivité trouvée dans les tissus et sa répartition dans les différents groupes de substances analysées.

Après 4 heures, les tissus ayant absorbé l'acide glutamique 3 — 4 ^{14}C contiennent le tiers de la radioactivité initiale du milieu, les tissus ayant absorbés l'acide glutamique 1^{14}C en contiennent les 3/5.

TABLEAU XVIII
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

	Acide glutamique 3-4 ^{14}C		Acide glutamique 1^{14}C	
	Radioactivi- té totale mesurée	Radioactivi- té par g de substance sèche	Radioactivi- té totale mesurée	Radioactivi- té par g de substance sèche
Milieu initial	1000		1000	
Milieu après ex- périence	623,7		385	
Radioactivité to- tale des tissus.				
Extrait soluble	381,1	371	573,4	324,9
total	380	370	570	323
Acides aminés li- bres.....	317	308	525	298
Acides organiques	86	83	37	22
Glucides et pepti- des	6,7	6,3	8,5	4,8
Résidu insoluble.	1,1	1	3,4	1,9

Radioactivité (milliers de coups par minute) des milieux de culture et des différents groupes de substances des tissus ayant absorbé de l'acide glutamique radioactif.

Pratiquement, toute la radioactivité est localisée dans l'extrait soluble, principalement dans les acides aminés et, dans une moindre mesure, dans les acides organiques. Le résidu insoluble et la fraction glucidique sont peu radioactifs.

Lorsque les activités des différents groupes de substances sont rapportées à 1 g de tissus secs, les valeurs obtenues pour les deux sortes d'acide glutamique sont très voisines. Seul le groupe des acides organiques est nettement plus radioactif avec l'acide 3 - 4 ^{14}C qu'avec l'acide 1^{14}C .

Le tableau XIX donne la radioactivité des différentes substances mesurées après élution.

TABLEAU XIX
Tissus de crown-gall de *Scorsonère*.

	Tissus mis en présence d'acide glutamique 3-4 ¹⁴ C	Tissus mis en présence d'acide glutamique 1 ¹⁴ C
Ac. glutamique	213	229,5
Glutamine	9,5	2,6
Ac. γ -amino-butyrique	25,2	0
Ac. pyrrolidone-carboxylique ...	32,2	18,9
Proline	1,7	5,2
Ac. aspartique	4,5	1,3
Alanine	0,3	0
Thréonine	Traces	0
Inconnu B	0,4	0
Ac. α -céto-glutarique	Traces	Traces
Ac. succinique	0,9	0,2
Ac. fumarique	0,4	Traces
Ac. malique	36,3	0,9
Ac. citrique et isocitrique (a) .	2,9	2,9
Ac. organique inconnu (b)	5,9	6,6
Autres inconnus divers	0,5	Traces
Sommes des activités retrouvées après élution	332,7	268,1

Répartition de la radioactivité (en milliers de coups par minute et par g de substance sèche) dans les différentes substances solubles extraites de tissus ayant absorbé de l'acide glutamique radioactif.

(a) non séparés sur les chromatogrammes.

(b) caractérisé par les Rf suivants :

— 0,07 avec l'alcool ammoniacal,

— 0,17 avec le butanol — acide formique.

Les photographies de la figure 6 montrent les radiochromatogrammes obtenus.

La somme des radioactivités retrouvées après élution représente 80% de la radioactivité totale des fractions contenant les acides aminés libres et les acides organiques. Le déficit est attribuable aux pertes au cours de la chromatographie et de l'élution.

C. — INTERPRÉTATIONS.

La très forte radioactivité de l'acide glutamique des tissus (plus de 75% de la radioactivité totale) indique que l'absorption de ce corps est beaucoup plus rapide que son utilisation. Seulement le quart de l'acide glutamique absorbé est métabolisé.

1° *Genèse des différentes substances radioactives obtenues.* Les diverses transformations de l'acide glutamique absorbé sont schématisées dans la figure 7.

— La radioactivité du résidu insoluble et celle de la fraction soluble non retenue sur les résines sont dues principalement à

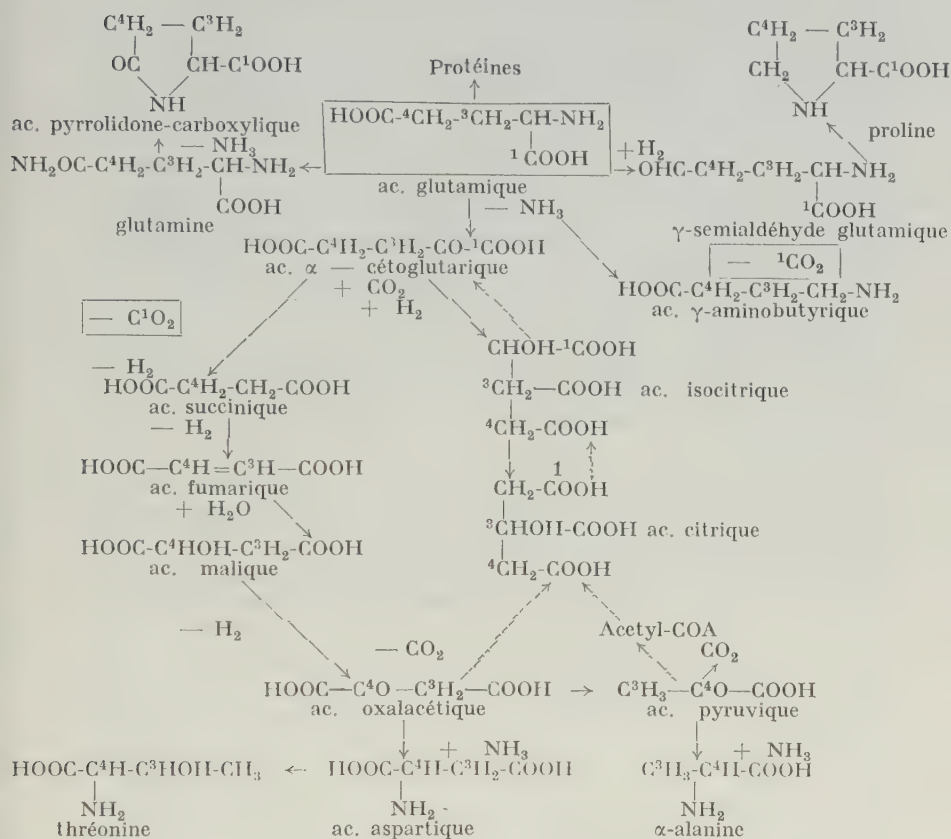


Fig. 7. — Réactions pouvant expliquer la genèse des différents métabolites radioactifs trouvés dans les tissus de crown-gall de Scorsonère, d'après les résultats obtenus après absorption d'acide glutamique marqué par ^{14}C soit en 3 et 4, soit en 1.

l'incorporation de l'acide glutamique dans les protéines et les peptides. En effet, les radiochromatogrammes des hydrolysats acides des protéines et peptides montrent que presque toute leur radioactivité est due à la présence d'acide glutamique. Cependant, des traces d'arginine marquée sont toujours décelables dans les hydrolysats protéiques. Des traces d'acide aspartique sont également présentes dans les hydrolysats peptidiques des tissus ayant assimilé l'acide glutamique 3 — 4^{14}C .

— La glutamine radioactive provient de l'amidation de l'acide glutamique. S'il est possible que l'acide pyrrolidone-carboxylique ait une origine physiologique et soit engendré au cours de réac-

tions biochimiques, il est également possible que sa présence soit un *artefact* dû à la décomposition de la glutamine au cours des extractions et séparations (ELLFOLK et SYNGE, 1955; KATZ et CHAIKOFF, 1954).

— La proline provient vraisemblablement d'une cyclisation de la chaîne carbonée de l'acide glutamique qui a été préalablement réduite en γ -semialdéhyde glutamique. Ce dernier composé peut également conduire à l'ornithine d'où dérive l'arginine. De tels mécanismes existent chez les animaux supérieurs (STETTEN, 1955) et les microorganismes (VOGEL, 1955). Chez les végétaux, la présence de la γ -semialdéhyde n'a jamais été démontrée, mais les relations entre la proline, l'arginine et l'acide glutamique ont été observées dans les tissus de Topinambour (DURANTON, 1956) et dans les germinations de pois chiches (SIVARAMAKRISHNAN et SARMA, 1956).

— L'acide γ -aminobutyrique est très radioactif lorsqu'il dérive de l'acide glutamique 3 — 4^{14}C , il est totalement dépourvu de radioactivité lorsqu'il dérive de l'acide 1^{14}C . Ces deux faits confirment l'origine de l'acide γ -aminobutyrique par perte du carboxyle 1 de l'acide glutamique (STEWART, THOMPSON et DENT, 1949).

— La présence d'acide α -cétoglutarique radioactif est due à une perte de la fonction NH_2 , soit par désamination oxydative, soit par transamination. La chaîne carbonée de l'acide glutamique est introduite dans les réactions du cycle de Krebs à la suite de ces réactions.

— Les activités des acides succinique, fumarique et malique sont très importantes lorsque l'acide glutamique 3 — 4^{14}C est utilisé. L'acide α -cétoglutarique, par perte de son carboxyle 1 et oxydation, donne naissance à l'acide succinique qui conduit *via* l'acide fumarique à l'acide malique. La très forte radioactivité présentée par ce dernier, lorsqu'il dérive de l'acide 3 — 4^{14}C laisse supposer son accumulation. De même l'acide aspartique est nettement radioactif. Il peut dériver de l'amination de l'acide oxalacétique issu lui-même de l'oxydation de l'acide malique, ou bien peut-être de la fixation de NH_3 sur la double liaison de l'acide fumarique (VIRTANEN, 1955).

— Par contre les acides dicarboxyliques et l'acide aspartique sont très faiblement radioactifs lorsque l'acide glutamique 1^{14}C est utilisé. La genèse de ces corps peut s'expliquer par une réaction de β -carboxylation de l'acide phosphoénolpyruvique reprenant le $^{14}\text{CO}_2$ libéré lors des décarboxylations des acides glutamique ou α -cétoglutarique (SALTMAN, KUNITAKE, SPOLTER et SPITTS, 1956; CHAMPIGNY, JOLCHINE et MOYSE, 1956).

— La radioactivité des acides citrique et isocitrique est identique, quelle que soit la position du ^{14}C dans les molécules de l'acide glutamique utilisé. Il n'est donc pas possible que la genèse de ces acides se déroule selon la réaction classique d'entrée des chaînons carbonés dans le cycle de KREBS :



En effet, dans cette réaction l'acide oxalacétique, accepteur d'un radical acétyle, tire son origine de l'oxydation de l'acide malique. S'il en était ainsi, les acides tricarboxyliques devraient être, comme l'est l'acide malique, beaucoup plus radioactifs lorsque l'acide glutamique 3 — 4^{14}C est utilisé. L'égalité de l'activité des acides citrique et isocitrique dans les deux cas peut, par contre, s'expliquer par la réaction suivante décrite par OCHOA (1952) :



L'apport extérieur d'acide glutamique, bien qu'il soit très faible pondéralement, a suffi pour inverser le sens habituel des réactions du cycle tricarboxylique. L'équilibre établi entre les acides isocitrique et α -cétoglutarique serait déplacé en faveur de la carboxylation de l'acide α -cétoglutarique.

— Après l'absorption d'acide glutamique 3 — 4^{14}C , l'alanine et la thréonine sont faiblement radioactives. L'alanine peut provenir de l'amination de l'acide pyruvique engendré par la décarboxylation de l'acide oxalacétique. Toutefois, l'acide pyruvique n'a pas été décelé parmi les produits radioactifs. La thréonine pourrait provenir d'une réduction de l'acide aspartique (BLACK et WRIGHT, 1955 ; COHEN, HIRSCH, WIESENDANGER et NISMAN, 1954).

— *L'inconnu B* est faiblement marqué lorsque l'acide glutamique 3 — 4^{14}C est utilisé. Aucune radioactivité n'est décelée après l'absorption de l'acide 1 — ^{14}C . *L'inconnu B* peut donc provenir indirectement de l'acide glutamique et sa genèse impliquerait une décarboxylation portant sur le carboxyle 1 de cet acide.

— Un certain nombre de substances radioactives présentes sur les chromatogrammes d'acides organiques n'ont pu être identifiées. C'est le cas notamment d'une substance caractérisée par les R_f suivants : 0,07 avec l'alcool ammoniacal et 0,17 avec le mélange butanol acide formique, elle possède une radioactivité assez importante.

— Enfin, on peut noter que les acides aminés suivants : sérine, glycocolle, phénylalanine, tyrosine, lysine, valine, leucine et méthionine, n'ont jamais présenté de radioactivité. Leur genèse ne peut donc avoir que des liens très indirects avec les réactions qui viennent d'être analysées.

2° Importance relative des voies d'utilisation de l'acide glutamique.

TOLBERT et NAYLOR (1956) avec des feuilles d'Orge alimentées en acide glutamique uniformément marqué et CHAMPIGNY (1958) avec de jeunes feuilles bouturées de *Bryophyllum Daigremontianum* alimentées en acide glutamique marqué en 3 — 4 ou en 1, ont constaté les mêmes voies dans la dispersion de la chaîne pentacarbonée de l'acide glutamique.

Les premières réactions qui provoquent cette dispersion sont au nombre de cinq :

- 1° Intégration dans les protéines et les peptides ;
- 2° Amidation avec formation de glutamine ;
- 3° Réduction en γ -semialdéhyde glutamique qui conduit à la genèse de la proline et de l'arginine ;
- 4° Décarboxylation avec formation d'acide γ -aminobutyrique ;
- 5° Désamination avec formation d'acide α -cétoglutarique.

L'importance relative de ces cinq voies peut être évaluée de la façon suivante :

— La mesure de la radioactivité de l'acide glutamique obtenu après hydrolyse du résidu insoluble et de la fraction neutre mesure l'intégration dans les protéines et les peptides.

— La formation de glutamine est déterminée par la somme des radioactivités de la glutamine et de l'acide pyrrolidone-carboxylique.

— La réduction en γ -semialdéhyde est mesurée par la radioactivité de la proline (la radioactivité de l'arginine, mise en évidence dans les hydrolysats protéiques est trop faible pour être mesurée avec exactitude).

— La formation d'acide γ -aminobutyrique est mesurée par la radioactivité de cet acide.

— La désamination est déterminée en faisant la somme des radioactivités de toutes les substances qui peuvent dériver de l'acide α -cétoglutarique (ac. succinique, fumarique, malique, citrique et isocitrique, aspartique, alanine, etc...) (CHAMPIGNY et LIORÉ, 1958).

Les résultats ainsi obtenus figurent dans le tableau XX.

Les valeurs données pour les trois premières voies de dispersion, qui conservent l'intégrité de la chaîne pentacarbonée, correspondent à la moyenne des radioactivités atteintes avec les deux sortes d'acide glutamique (3 — 4^{14}C et 1^{14}C). Pour les deux autres voies, les valeurs correspondent aux résultats obtenus avec l'acide glutamique 3 — 4^{14}C .

— L'intégration de l'acide glutamique dans les protéines

représente une faible part de son métabolisme. L'ordre de grandeur de cette intégration est le même pour des feuilles de *Bryophyllum* mises à l'obscurité (CHAMPIGNY, 1958).

— La formation de glutamine représente une voie d'utilisation très importante de l'acide glutamique. Le même fait se retrouve avec les feuilles d'Orge et de *Bryophyllum*.

— La formation de proline est peu importante. De même, TOLBERT et NAYLOR (1956) ne trouvent que des traces de proline radioactive dans les feuilles d'Orge alimentées en acide glutamique marqué.

TABIEAU XX
Tissus de crown-gall de Scorsonère.

Réactions affectant l'acide glutamique	Radioactivité de l'acide glutamique (en milliers de coups/min/g de matière sèche) engagé dans les différentes voies de transformation.	Importance relative de ces réactions en % de l'acide glutamique métabolisé.
1) Intégration dans les protéines et peptides	7,9	7
2) Amidation (→ glutamine)....	31,6	26
3) Réduction (→ γ -semialdéhyde glutamique).....	3,4	3
4) Décarboxylation (→ ac. γ -aminobutyrique)	25,2	21
5) Désamination (→ ac. α -céto-glutarique)	45,7	38
Inconnues	5,9	5
Total	119,7	100

Importance relative des diverses voies possibles d'engagement de l'acide glutamique dans le métabolisme.

— L'accumulation d'acide γ -aminobutyrique radioactif est assez importante dans les tissus de crown-gall. Elle est beaucoup plus faible dans les feuilles (Orge ou *Bryophyllum*) en aérobiose. Pour des feuilles d'Orge laissées en anaérobiose et à l'obscurité, cette accumulation est très importante, et affecte 75% de l'acide glutamique métabolisé (TOLBERT et NAYLOR 1956). L'accumulation d'acide γ -aminobutyrique peut être due, soit à une accélération des réactions de décarboxylation, soit à un ralentissement des réactions de synthèse qui peuvent l'utiliser. STEWARD, BIDWELL et YEMM (1956) ont montré à ce propos que cet acide aminé se carboxyle facilement avec régénération de l'acide glutamique.

NITSCH et NITSCH (1957) ont montré qu'il peut être utilisé comme aliment azoté unique pour assurer la croissance des tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. De toute façon, l'accumulation d'acide γ -aminobutyrique par les tissus en culture peut être rapprochée de l'accumulation parallèle effectuée par les feuilles en anaérobiose. Il est possible que les cellules des colonies tissulaires, en raison de l'épaisseur et de la compacité des tissus reçoivent moins d'oxygène que les cellules des feuilles.

— Pour les tissus de crown-gall, comme pour les feuilles à l'obscurité, la genèse de l'acide α -cétoglutarique représente la part la plus importante des transformations de l'acide glutamique.

Les faits observés n'ont apporté que peu de renseignements sur l'origine de l'inconnu B, si ce n'est qu'il peut dériver indirectement de l'acide glutamique après une décarboxylation. Toutefois, ils ont fourni de nombreux renseignements sur le métabolisme intermédiaire des tissus de crown-gall (LIORET, 1957 b).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans la première partie de ce travail j'ai tenté de déterminer les rapports qui se manifestent entre la croissance et la respiration, ou plus précisément entre la formation de nouvelle matière végétale et les dégradations, dans les tissus cultivés *in vitro*. Des tissus aux potentialités différentes ont été utilisés à cette fin : tissus sains de xylème de *Scorzonera hispanica* L. ensemencés pour la première fois et tissus de crown-gall de la même espèce, maintenus en culture depuis plusieurs années. Ces tissus ont été cultivés en présence ou non de substances excitoformatrices (ac. α -naphtalène-acétique, lait de Coco) ou inhibitrice (hydrazide maléique), à différentes concentrations.

Les variations pondérales des tissus, celles des principaux groupes de constituants, ainsi que les variations de l'intensité des échanges gazeux ont été déterminées.

Les résultats obtenus ont fourni divers renseignements physiologiques qui permettent d'illustrer les conclusions suivantes :

— L'analyse de la notion de croissance et des différents tests habituellement utilisés pour l'exprimer quantitativement (poids de substance fraîche, de substance sèche, de protéines) montre que les divers constituants cellulaires (substances protoplasmiques, substances inertes vacuolaires ou membranaires, eau) peuvent varier dans des proportions différentes. L'indépendance relative des divers tests est particulièrement sensible chez des tissus cultivés en présence de différentes substances de croissance utilisées à des concentrations variées. Aussi le choix d'un seul test de croissance peut-il être déconseillé.

— La signification des différents modes d'expression de l'intensité respiratoire est également analysée. Les variations des échanges gazeux des différents lots de tissus sont examinées en fonction des variations de la masse protoplasmique déduite de la quantité d'azote protéique, et des variations de l'activité du protoplasme définie par l'intensité des échanges gazeux exprimés par mg d'azote protéique.

— Des calculs inspirés des hypothèses et des résultats établis d'après l'étude de la croissance des Moisissures (TAMIYA) tentent de déterminer, dans les échanges respiratoires totaux, la part qui est liée à la croissance (*respiration de croissance*) et la part qui est liée à l'entretien (*respiration d'entretien*).

Les variations physiologiques présentées par les tissus au cours de la culture peuvent être interprétées de la façon suivante :

La mise en culture sur un milieu neuf soumet les tissus à un choc qui se traduit par une augmentation rapide de l'activité respiratoire du protoplasme. Cette augmentation est principalement due à l'afflux d'aliments glucidiques provenant du milieu. Cet afflux peut atteindre rapidement toutes les cellules, en raison de la petite taille des explantats initiaux (*Phase de choc*).

Peu de temps après se manifeste une synthèse très intense de protoplasme, marquée par une protéogénèse très active. Les échanges respiratoires sont élevés. Une part importante de l'énergie respiratoire est liée aux synthèses qui se font avec un bon rendement énergétique (*Phase de jeunesse ou de protéogénèse*).

Ensuite la protéogénèse et l'intensité respiratoire tendent à se stabiliser. Les synthèses des substances paraplasmiques, en particulier des substances membranaires, prennent de plus en plus d'importance dans l'accroissement pondéral des colonies. La part de l'énergie respiratoire utilisée pour l'entretien des tissus devient de plus en plus grande (*Phase adulte ou d'équilibre*).

Dans une dernière phase, l'appauvrissement du milieu et la grande taille des colonies rendent plus difficile l'alimentation de toutes les cellules. Les synthèses protéiques se ralentissent au point de s'annuler. Presque toute l'énergie respiratoire est utilisée pour l'entretien. L'intensité des échanges gazeux des colonies diminue. Si une faible croissance se manifeste encore, elle se réalise avec un très mauvais rendement (*Phase de sénescence*).

Ces quatre phases se déroulent en trois semaines pour les fragments de tubercule. Cet ensemble de faits est résumé dans le tableau suivant.

A concentration moyenne (10^{-6} , 10^{-7}) l'acide α -naphtalène-acétique prolonge la phase adulte, mais stimule les dégradations et augmente les dépenses apparentes d'entretien des tissus. A concentration plus élevée, il stimule encore plus l'intensité des dégradations et rend plus rapidement sensibles les phénomènes de sénescence.

Le lait de Coco, par son action favorable sur la protéogénèse, prolonge la phase adulte.

L'hydrazide maléique inhibe plus rapidement les synthèses que les dégradations.

Lots de tissus	0-1 jour	1-8 jours	8-15 jours	15-22 jours
Témoins	CHOC Protéogenèse faible ou nulle Synthèse des substances inertes nulle. IRc augmente beaucoup. IRNp augmente beaucoup. QR s'élève.	JEUNESSE Protéogenèse intense. Synthèse active des substances inertes. IRc augmente légèrement. IRNp diminue. QR > 1. Rendement de croissance élevé.	ADULTE Protéogenèse moins intense. Synthèse active des substances inertes. IRc constante ou diminue. IRNp diminue légèrement. QR diminue. Rendement de croissance faible.	SENESCENCE Protéogenèse nulle. Synthèse des substances inertes encore active. IRc diminue. IRNp diminue. QR = 1. Rendement de croissance très faible.
ANA 10 ⁻⁶	CHOC idem	JEUNESSE Protéogenèse intense. Synthèse active de substances inertes. IRc augmente fortement. IRNp constante. QR > 1 Rendement de croissance élevé.	ADULTE Protéogenèse encore importante. Synthèse active de substances inertes. Forte hydratation des tissus. IRc augmente légèrement. IRNp diminue. QR = 1 Rendement de croissance faible.	
ANA 10 ⁻⁵	CHOC idem	JEUNESSE Protéogenèse intense. Synthèse active de substances inertes. IRc augmente très fortement IRNp augmente légèrement. QR > 1 Rendement de croissance élevé.	ADULTE + SENESCENCE Protéogenèse faible. Synthèse active de substances inertes. Epuisement des glucides solubles Très forte hydratation des tissus. IRc diminue. IRNp diminue. QR = 1 Très mauvais rendement de croissance.	SENESCENCE Protéogenèse nulle.

Lait de Coco 10 %	0-1 jour	1-8 jours	8-15 jours	15-22 jours
	CHOC idem	JEUNESSE Protéogénèse très intense. Synthèse active de substances inertes. IRc augmente très fortement IRNp diminue. QR > 1 Très bon rende- ment de crois- sance.	ADULTE Protéogénèse active. Synthèse active de substances inertes. IRc stable puis diminue. IRNp diminue légèrement. QR = 1 Rendement de croissance moins élevé.	
Hydrazide maléique 10 ⁻⁴	CHOC idem	JEUNESSE + ADULTE Protéogénèse très faible. Synthèse de substances inertes nulle. IRc constante. IRNp diminue légèrement. QR > 1 Mauvais rende- ment de crois- sance.	SENESCENCE Protéogénèse nulle. Synthèse de substances inertes nulle. IRc diminue fortement. IRNp diminue fortement. QR = 1 Croissance nulle.	

IRc = Intensité respiratoire exprimée par colonie tissulaire.

IRNp = Intensité respiratoire exprimée par mg d'N protéique.

QR = Quotient respiratoire.

Pour les colonies de crown-gall la phase de jeunesse et la phase adulte s'étendent sur une plus grande durée. Après 6 semaines, la phase de sénescence n'est pas atteinte. Les phénomènes principaux peuvent être schématisés ainsi :

1-8 jours	8-15 jours	15-45 jours
CHOC + JEUNESSE Protéogénèse rapide. Synthèse active de substances inertes. Accumulation de saccharose. IRs augmente. IRNp augmente. QR > 1 Rendement de crois- sance moyen.	JEUNESSE Synthèse de gluco- fructosanes. IRs constante. IRNp diminue. QR > 1 Rendement de crois- sance élevé.	ADULTE Protéogénèse encore active. Synthèse très active de substances inertes. IRs diminue. IRNp se stabilise. QR diminue devient = à 1. Rendement de croissance moins élevé.

L'acide α -naphthalène-acétique n'a qu'une action discrète sur ces tissus. Le lait de Coco accentue les phénomènes se déroulant pendant la phase de jeunesse.

Dans la seconde partie, les acides aminés libres et les acides aminés obtenus après hydrolyse des peptides et des protéines des tissus sains et des tissus de crown-gall de Scorsonère sont comparés.

Les tissus de crown-gall sont plus pauvres en tryptophane libre et en asparagine que les tissus sains. Ils possèdent par contre, en grande quantité, un corps non identifié, l'*inconnu B*, présent seulement à l'état libre et réagissant à la ninhydrine. Ce corps a été retrouvé dans des tissus tumoraux de *Nicotiana Tabacum* L., d'*Helianthus tuberosus* L. et de *Parthenocissus tricuspidata* Planchon.

Plusieurs centaines de mg de cette substance ont été isolés à l'état cristallisé. Les résultats fournis par les analyses chimiques n'ont pas encore permis de préciser sa structure (1). La signification physiologique de la formation et de l'accumulation de l'*inconnu B* par les tissus de crown-gall reste à préciser également.

L'utilisation d'acide glutamique marqué par ^{14}C , soit en 3 et 4, soit en 1, par les tissus de crown-gall de Scorsonère, montre que l'*inconnu B* peut provenir indirectement de l'acide glutamique, ce dernier ayant préalablement perdu son carboxyle 1. L'analyse des différentes substances radioactives obtenues a permis de reconnaître l'importance d'un certain nombre de réactions du métabolisme intermédiaire qui lient entre eux acides aminés et acides organiques. Ainsi ont été reconnues l'importance de la désamination de l'acide glutamique d'une part et de la formation de glutamine d'autre part, qui sont les principaux modes d'utilisation de l'acide glutamique absorbé. La désamination peut être suivie d'une carboxylation de l'acide α -cétoglutarique, avec synthèse directe des acides tricarboxyliques.

La décarboxylation en acide γ -aminobutyrique, la réduction en γ -semialdéhyde qui aboutit à la formation de proline ou d'arginine, ainsi que l'intégration directe dans les molécules de protéines, sont également des transformations non négligeables de l'acide glutamique.

Les différents résultats obtenus soulignent l'intérêt des cultures de tissus *in vitro*, dans l'étude du métabolisme des cellules hétérotrophes des végétaux supérieurs.

(1) Voir note p. 94

BIBLIOGRAPHIE

- ACHER (R.) et CROCKER (C.), 1952. — Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 704-705.
- AUDUS (L. J.), 1935. — Mechanical stimulation and respiration rate in the cherry laurel. *New Phytol.*, **34**, 386-402.
- AUDUS (L. J.), 1939. — Mechanical stimulation and respiration rate in the green leaf. II : Investigations on a number of angiospermic species. *New Phytol.*, **38**, 284-288.
- AUDUS (L. J.), 1941. — Mechanical stimulation and respiration rate in the green leaf. V : Relation of mechanical effects to leaf turgidity. *New Phytol.*, **40**, 92-95.
- AUDUS (L. J.), 1949. — The mechanism of auxin action. *Biol. Rev.*, **24**, 51-93.
- AUDUS (L. J.), 1953. — *Plant growth substances*. (Léonard Hill Ltd, London). 465 p.
- AUDUS (L. J.), 1954. — The mechanism of auxin action. 8^e Cong. intern. Bot. (Paris 1954), section 11, 138-144.
- BACH (D.), 1933. — Le dosage de l'azote nitrique par la méthode de Devarda. Application aux milieux biologiques. *Bull. Soc. pharmacol.*, **39**, 607-614.
- BALL (E.), 1955. — Studies of the nutrition of the callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Année biol.*, **31**, 81-105.
- BARNELL (H. R.), 1937. — Analytic studies in plant respiration. VII. *Proc. Royal Soc. (London). Ser. B.*, **123**, 321-342.
- BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (G.), 1936. — Recherche sur la composition chimique des tumeurs de la betterave déterminées par *Bacillus tumefaciens*. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **123**, 942-944.
- BERTOSSI (F.), 1955. — Antagonistes synthétiques de croissance. *Année Biol.*, **31**, 31-43.
- BERTOSSI (F.) et CAPOZZI (A.), 1951. — Azione della idrazide maleica su tessuti vegetali *in vitro*. *N. giorn. Bot. Ital.*, **58**, 184-185.
- BERTOSSI (F.) et CAPOZZI (A.), 1952. — Azione della idrazide maleica sulla callogenese di tessuti vegetali *in vitro*. *Boll. Soc. Ital. Sper.*, **28**, 1117-1118.
- BITANCOURT (A. A.), 1954. — La nature des auxines des tumeurs végétales. *Année Biol.*, **30**, 361-370.
- BLACK (S.) et WRIGHT (N. C.), 1955. — Intermediate steps in the biosynthesis of threonine. *Amino Acid Metabolism*, (Johns Hopkins press, Baltimore), 591-600.
- BONNER (J.) et BANDURSKI (R. S.), 1952. — Studies of the physiology, pharmacology and biochemistry of the auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **3**, 39-86.

- BONNER (J.), BANDURSKI (R. S.) et MILLERD (A.), 1953. — Linkage of respiration to auxin induced water uptake. *Physiol. Plant.*, **6**, 511-522.
- BOUILLENNE (M.) et BOUILLENNE-WALRAND (R.), 1926. — Contribution à l'étude de la respiration en fonction de l'hydratation. Echanges respiratoires des racines tubérisées de *Brassica napus*. *Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, **2**, 426-467.
- BOULANGER (P.) et BISERTE (G.), 1951. — Chromatographie sur papier des acides aminés et des polypeptides des liquides biologiques. II : Modifications techniques et résultats nouveaux (Plasma sanguin). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1930-1939.
- BRAUN (A. C.), 1954 a. — The physiology of plant tumors. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **5**, 133-162.
- BRAUN (A. C.) et MOREL (G.), 1950. — A comparaison of normal, habituated and crown-gall tumor tissue implants of european grape. *Amer. J. Bot.*, **37**, 499-501.
- BRENNER (M.) et FREY (R.), 1951. — Ueber die Entsalzung von Lösungen neutraler Aminosäuren mit Hilfe Ionenaustauschern und ein neues präparatives Verfahren zur Gruppentrennung von Aminosäuren in Erweiss Hydrolysaten. *Helvet. Chim. Act.*, **34**, 1701-1711.
- BRYAN (W. H.) et NEWCOMB (E. H.), 1954. — Stimulation of pectin methylesterase activity of cultured Tobacco pith by indoleacetic acid. *Physiol. Plant.*, **7**, 290-297.
- BUVAT (R.), 1946 a. — Evolution du chondriome dans les cultures de tissus de Chicorée à café (*Cychorium intybus* L.). Opération de prélèvement. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **222**, 970-971.
- BUVAT (R.), 1946 b. — Action de l'eau sur le chondriome des cellules de la racine de Chicorée à café. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **222**, 1187-1189.
- CAMUS (G.), 1956. — La transformation tumorale chez les végétaux : quelques données récentes sur le mode d'action de la Bactérie sur le crown-gall. *Bull. Soc. Fr. Physiol. végét.*, **2**, 64-72.
- CAMUS (G.) et GAUTHERET (R. J.), 1948. — Sur le repiquage des proliférations induites sur des fragments de racines de Scorsonère par les tissus de crown-gall et les tissus ayant subi le phénomène d'accoutumance aux hétéro-auxines. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **142**, 771.
- CAMUS (G.) et LANCE (C.), 1955. — Action de la Penicilline G sur le développement de tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Année Biol.*, **31**, 63-79.
- CAMUS (G.), WILDMAN (S. G.) et BONNER (J.), 1951. — Comparative study of the soluble proteins of crown gall and normal tissues of sunflower cultivated *in vitro*. *Bull. Amer. Inst. Biol. Sc.*, **1**, 34.
- CAPLIN (S. M.) et STEWARD (F. C.), 1948. — Effect of coconut milk on the growth of explants from Carrot root. *Science*, **108**, 655-657.
- CHAMPIGNY (M. L.), 1956. — L'incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ dans les aminoacides des feuilles de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger en photosynthèse. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **243**, 83-85.
- CHAMPIGNY (M. L.), 1958. — Etude du métabolisme de l'acide glutamique dans les feuilles et les racines de *Bryophyllum Daigre-*

- montianum* Berger à l'aide d'acide glutamique marqué par ^{14}C en 1 ou en 3 - 4. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **246**, 626-629.
- CHAMPIGNY (M. L.), JOLCHINE (G.) et MOYSE (A.), 1956. — La fixation de $^{14}\text{CO}_2$ par les feuilles de *Bryophyllum* (Crassulacées), à la lumière et à l'obscurité; photosynthèse, métabolisme des acides organiques et des amino-acides. *Communicat. 75^e Cong. de l'A. F. A. S. (Dijon, 1956)*.
- CHAMPIGNY (M. L.) et LIORET (C.), 1955. — Sur la présence de β -alanine dans les plantes supérieures. *Experientia*, **XI**, 354.
- CHAMPIGNY (M. L.) et LIORET (C.), 1958. — Utilisation de l'acide glutamique par des tissus et organes de plantes supérieures. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **4**, 61-63.
- CHIBNALL (A. C.), 1939. — *Protein metabolism in the plant* (Yale University Press). 306 p.
- COHEN (G. N.), HIRSCH (M. L.), WIESENDANGER (S. B.) et NISMAN (R.), 1954. — Précisions sur la synthèse de la l-thréonine à partir d'acide l-aspartique par des extraits de *Escherichia coli*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **238**, 1746-1748.
- COMMONER (B.) et THIMANN (K. V.), 1941. — On the relation between growth and respiration in *Avena coleoptile*. *J. Gener. Physiol.*, **24**, 279-296.
- COVA (V.), 1942-1943. — Colturi di tessuti vegetali. *Nota IV*. — Recherche sul contenuto di zuccheri nelle culture di « *Daucus Carota* ». *Atti reale Acad. Sc. (Torino)*, **78**, 203-220.
- CRUMPLER (H. R.), et DENT (C. E.), 1949. — Distinctive test for α -aminoacids in paper chromatography. *Nature*. **164**, 441-442.
- DEDONDER (R.), 1952. — Les glucides du Topinambour. Contribution à l'étude de leur structure et de leur biochimie. *Thèse Fac. Sc. Paris*. 84 p.
- DENT (C. E.), 1948. — A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrine reacting substances on phenol collidine filter paper chromatograms with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids. *Biochem J.*, **43**, 169-180.
- DUHAMET (L.), 1949. — Action du lait de Coco sur la croissance des tissus de tubercule de topinambours cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **229**, 1353-1355.
- DUHAMET (L.), 1950 a. — Action du lait de Coco sur la croissance des tissus de *Parthenocissus tricuspidata* cultivés *in vitro*. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **144**, 59-61.
- DUHAMET (L.), 1950 b. — Action du lait de Coco sur la croissance de tissus de crown-gall de Scorsonère cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **230**, 770-771.
- DUHAMET (L.) 1951 a. — Action du lait de Coco sur la croissance des cultures de tissus de crown-gall de Vigne, de Tabac, de Topinambour et de Scorsonère. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **145**, 1781-1783.
- DUHAMET (L.), 1951 b. — Action du lait de Coco sur les tissus accoutumés aux hétéro-auxines de Scorsonère, de Tabac et de Vigne. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **145**, 1783-1785.
- DUHAMET (L.), 1953. — Recherches préliminaires sur les variations de la prolifération de cultures de tissus végétaux en fonction du poids de l'explantat ensemencé. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **147**, 81-83.

- DURANTON (H.). 1956. — Métabolisme de l'arginine libre dans les tissus de tubercule de Topinambour. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **2**, 74-75.
- DURANTON (H.) et MOREL (G.). 1958. — Evolutions des acides aminés libres dans des fragments de tubercules de Topinambour cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sc. (Paris)*, **246**, 2927-2930.
- EBERTS (F. S.), BURRIS (R. H.) et RIKER (A. J.), 1951. — The effect of indole-3-acetic acid and common organic acids on the respiration of slices from tomato stem and crown-gall tissue. *Amer. J. Bot.*, **38**, 618-621.
- EBERTS (F. S.), BURRIS (R. H.) et RIKER (A. J.), 1954. — The metabolism of nitrogenous compounds by sunflower crown-gall tissue cultures. *Plant Physiol.*, **29**, 1-10.
- ELLFOLK (N.) et SYNGE (R. L. M.), 1955. — Detection of pyrrolidone-carboxylic acid. *Biochem. J.*, **59**, 523-526.
- GALSTON (A. W.), 1951. — Sur la relation entre la croissance des cultures de tissus végétaux et leur teneur en catalase. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **232**, 1505-1507.
- GARBERS (C. F.), SCHMID (H.) et KARRER (P.), 1954. — Modifikation der C-Methylbestimmungsmethode bei Verweidung kleinster Substanzmengen. *Helv. Chim. Act.*, **37**, 1336-1338.
- GARREAU (M.), 1851. — De la respiration chez les plantes. *Ann. Sc. Nat.*, 3^e S. *Bot.*, **15**, 5-36.
- GAUTHERET (R. J.), 1942 a. — Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 13-47.
- GAUTHERET (R. J.), 1942 b. — Recherches sur le développement de fragments de tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Rev. Cyt.*, **6**, 85-180.
- GAUTHERET (R. J.), 1942 c. — Manuel technique de culture des tissus végétaux. (Masson, édit. Paris), 172 p.
- GAUTHERET (R. J.), 1945. — *Une voie nouvelle en biologie végétale : la culture des tissus*. (Gallimard édit., Paris), 203 p.
- GAUTHERET (R. J.), 1948. — Sur la culture de trois types de tissus de Scorsonère : tissus normaux, tissus de crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéro-auxine. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **226**, 270-271.
- GAUTHERET (R. J.), 1949. — Vues nouvelles sur le cancer végétal ; comparaison avec le cancer animal. *Sem. médic. des hôpitaux*, **4**, 162-169.
- GAUTHERET (R. J.), 1952. — Recherches sur l'action combinée de l'hydrazide maléique et de l'acide indoleacétique sur les cultures de Topinambour. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **234**, 2218-2220.
- GAUTHERET (R. J.), 1955 a. — Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus végétaux. *Année biol.*, **31**, 145-171.
- GAUTHERET (R. J.), 1955 b. — Nutrition of plant tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **6**, 433-484.
- GAUTHERET (R. J.), 1959. — La culture des tissus végétaux, Techniques et réalisations, (Masson édit., Paris). 884 p.
- GOODWIN (R. H.) et GODDARD (D. R.), 1940. — The oxygen consumption of isolated woody tissues. *Amer. J. Bot.*, **27**, 235-237.

- GORDON (H. T.), THORNBURG (W.) et WERUM (L. N.), 1956. — Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds. *Anal. Chem.*, **28**, 849-855.
- GORIS (A.), 1947 a. — Epuisement des réserves glucidiques de fragments de tubercules de Carotte cultivés *in vitro* sur milieux dépourvus de sucres. Influence de l'action de l'acide indole-3-acétique en fonction de la saison. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **141**, 1131-1134.
- GORIS (A.), 1947 b. — Hydratation des fragments de tubercules de Carotte et de Topinambour cultivés *in vitro* sur milieux dépourvus de sucres. Influence de l'acide indole-3-acétique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **141**, 1205-1207.
- GORIS (A.), 1948 a. — Epuisement des réserves glucidiques des souches de tissus et de fragments de tubercules de Carotte maintenus *in vitro* sur milieux dépourvus de sucres. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **226**, 105-107.
- GORIS (A.), 1948 b. — Epuisement des réserves glucidiques des fragments de tubercules de Topinambour cultivés *in vitro* sur milieux dépourvus de sucres. Influence de l'acide indole-3-acétique. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **226**, 742-744.
- GORIS (A.), 1950. — Influence comparée de l'acide indole-3-acétique et du lait de Coco sur les réserves glucidiques des souches de tissus de Carotte. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **231**, 870-872.
- GORIS (A.), 1954. — Transformations glucidiques intracellulaires. *Année Biol.*, **30**, 297-318.
- GORIS (A.) et BOURQUET (R.), 1953. — Action de l'hydrazide maléique sur les tissus de Carotte cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1401-1408.
- GORIS (A.) et DUHAMET (L.), 1958. — Etude de l'action du lait de Coco sur la croissance et la composition glucidique des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Rev. génér. Bot.*, **65**, 5-48.
- GORIS (A.) et PHOUPHAS (C.), 1952. — Sur la modification des taux de saccharose et d'inuline sous l'influence de l'hydrazide maléique dans les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **234**, 2002-2004.
- GREULACH (U. A.), 1951. — The effect of maleic hydrazide on tomato plants in relation to their age and the time of treatment. *Plant Physiol.*, **26**, 849-852.
- HACKETT (D. P.) et THIMANN (K. V.), 1952 a. — The effect of auxin on growth and respiration of artichoke tissue. *Proc. Natl. Acad. Sc. (Washington)*, **38**, 770-773.
- HACKETT (D. P.) et THIMANN (K. V.), 1952 b. — The nature of the auxin induced water uptake by Potato tissue. *Amer. J. Bot.*, **39**, 553-559.
- HACKETT (D. P.) et THIMANN (K. V.), 1953. — The nature of the auxin induced water uptake by Potato tissue. II : The relation between respiration and water absorption. *Amer. J. Bot.*, **40**, 182-188.
- HANSON (J. B.) et BONNER (J.), 1954. — The relationship between salt an water uptake in Jerusalem artichoke tuber tissue. *Amer. J. Bot.*, **41**, 702-710.

- HELLER (R.), 1948. — De l'influence de la concentration en ions potassiques du milieu sur la croissance des cultures de tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **143**, 335-338.
- HELLER (R.), 1953. — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Thèse Fac. Sc. (Paris)*, 223 p.
- HENDERSON (J. H. M.) et BONNER (J.), 1952. — Auxin metabolism in normal and crown-gall tissue of Sunflower. *Amer. J. Bot.*, **39**, 444-451.
- JOLCHINE (G.), 1956. — Les acides organiques des feuilles de « *Bryophyllum Daigremontianum Berger* ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **38**, 481-493.
- JOSEPHSON (L.), 1951. — Effect of maleic hydrazide in delaying flowering in corn. *Agron. J.*, **43**, 404-405.
- KANDLER (O.), 1953 a. — Untersuchungen über die Wirkung von 2-4 Dichlorophenoxyessigsäure, Natrium-fluorid und Vitamin B1 auf den Stoffwechsel *in vitro* kultivierter Maiswurzeln. *Planta*, **42**, 304-348.
- KANDLER (O.), 1953 b. — Ueber den « Synthetischen Wirkungsgrad » *in vitro* kultivierter Embryonen, Wurzeln und Sprosse. *Zeits. für Naturf.*, **8b**, 109-117.
- KANDLER (O.), 1955. — Consideration of energetics in tissue culture. *Année Biol.*, **31**, 173-184.
- KATZ (J.) et CHAIKOFF (I. L.), 1954. — A chromatographic radio-graphic method for study of acetate utilization in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **206**, 887-900.
- KIDD (F.), WEST (C.) et BRIGGS (C.), 1921. — A quantitative analysis of the growth of *Helianthus annuus*. Part I : The respiration of the plant and of its parts throughout the life cycle. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **92**, 368-384.
- KLEIN (R. M.), 1952. — Nitrogen and phosphorus fractions, respiration and structure of normal and crown-gall tissues of tomato. *Plant Physiol.*, **27**, 335-354.
- KLEIN (R. M.), 1957. — Growth and differentiation of plant tissue cultures. *Rhythmic and synthetic processes in growth*, Princeton University Press (Princeton), 31-58.
- KLEIN (R. M.) et LINK (G. K. K.), 1955. — The etiology of crown-gall. *Quart. Rev. of Biol.*, **30**, 207-277.
- KUHN (R.) et ROTH (H.), 1934. — Mikro-Bestimmung von Acetyl-Benzoyl und C-methylgruppen. *Ber. der deut. chem. Gesell.*, **66**, 1274-1278.
- KULESCHA (Z.), 1951. — Recherches sur l'élaboration des substances de croissance par les tissus végétaux. *Thèse Fac. Sc. (Paris)*, 144 p.
- KULESCHA (Z.), 1953. — Action de l'hydrazide maléique sur la prolifération des tissus de crown-gall de Scorsonère et sur leur teneur en auxine. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **236**, 958-959.
- KULESCHA (Z.), 1954. — Action de l'hydrazide maléique sur l'élaboration d'auxine par les tissus de Topinambour cultivés *in vitro* en présence de substances de division. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **238**, 1060-1062.
- LACHAUX (M.), 1944 a. — Respiration des tubercules de Carotte et de Topinambour. Variations sous l'influence des traumatismes. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **219**, 218-220.

- LACHAUX (M.), 1944 b. — Etude de la respiration des tissus végétaux isolés, cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **219**, 258-260.
- LACHAUX (M.), 1944 c. — Respiration des tissus de tubercules de Carotte et de Topinambour. Influence du glucose et de l'acide indole-3-acétique. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **219**, 244-246.
- LACHAUX (M.), 1944 d. — Etude de la respiration des tissus végétaux isolés, cultivés *in vitro*. Influence de l'acide indole-3-acétique sur la respiration des tissus de Topinambour. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **219**, 291-293.
- LANCE (C.), 1956. — Recherches préliminaires sur les systèmes oxydasiques de tumeurs primaires obtenues par inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les fragments de tubercules de Topinambour cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **2**, 76-77.
- LANCE (C.), 1957. — Remarques sur l'emploi des différents critères de croissance dans le cas de tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Rev. génér. Bot.*, **64**, 123-130.
- LEE (A. E.), 1952. — Nitrogen and aminoacids in normal, habituated and bacteria free crown-gall tumor tissue cultures of grape. *Plant Physiol.*, **27**, 173-178.
- LEOPOLD (A. C.) et KLEIN (W. H.), 1951. — Maleic hydrazide as an antiauxin in plants. *Science*, **114**, 9.
- LEOPOLD (A. C.) et KLEIN (W. H.), 1952. — Maleic hydrazide as an antiauxin. *Physiol. Plant.*, **5**, 91-99.
- LEVITT (J.), 1953. — Further remarks on the thermodynamics of active (non osmotic) water absorption. *Physiol. Plant.*, **6**, 240-252.
- LINK (G. K. K.), 1932. — The role of genetics in etiological plant pathology. *Quart. Rev. Biol.*, **7**, 127-171.
- LINK (G. K. K.) et EGGERS (V.), 1941. — Hyperauxiny in crown-gall of tomato. *Bot. Gaz.*, **103**, 87-106.
- LIORET (C.), 1952 a. — Echanges gazeux respiratoires de tissus de crown-gall de Scorsonère (*Scorzonera hispanica* L.) cultivés *in vitro* en présence d'acide α -naphtalène-acétique. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **234**, 237-239.
- LIORET (C.), 1952 b. — Action du « lait de Coco » sur les échanges gazeux respiratoires de tissus de crown-gall de Scorsonère (*Scorzonera hispanica* L.) cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **234**, 648-650.
- LIORET (C.), 1953 a. — Action de l'acide α -naphtalène-acétique sur le métabolisme des tissus de racine de Scorsonère, cultivés *in vitro*. I : Accroissement des cultures et variations des constituants azotés et glucidiques. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **236**, 311-313.
- LIORET (C.), 1953 b. — Action de l'acide α -naphtalène-acétique sur le métabolisme des tissus de racine de Scorsonère. II : Variations des échanges gazeux respiratoires. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **236**, 504-506.
- LIORET (C.), 1955. — Recherches sur le métabolisme des cultures de tissus normaux et pathologiques. *Année Biol.*, **31**, 185-194.
- LIORET (C.), 1956. — Sur la mise en évidence d'un acide aminé non identifié particulier aux tissus de crown-gall. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **2**, 76.

- LIORET (C.), 1957 a. — Les acides aminés libres des tissus de crown-gall cultivés *in vitro*. Mise en évidence d'un acide aminé particulier à ces tissus. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **244**, 2171-2174.
- LIORET (C.), 1957 b. — Sur le métabolisme de l'acide glutamique dans les tissus de crown-gall de *Scorsonère* cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **245**, 1329-1331.
- MAC ILRATH (W. J.), 1950. — Response of the Cotton plant to maleic hydrazide. *Amer. J. Bot.* **37**, 816-819.
- MANIGAULT (P.) et JUSSIER (J.), 1951. — Techniques d'étude de la répartition de la phosphatase au cours du développement des tumeurs expérimentales chez *Pelargonium Zonale*. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **145**, 1788-1790.
- MENORET (Y.), 1957. — Les acides aminés libres de la racine de Carotte et leur variation au cours de la culture des tissus. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **244**, 488-489.
- MILLER (J. M. Jr) et BURRIS (R. H.), 1951. — Effect of plants growth substances upon oxidation of ascorbic and glycolic acids by cell free enzymes from barley. *Amer. J. Bot.*, **38**, 547-549.
- MITCHEL (J. E.), BURRIS (R. H.) et RIKER (A. J.), 1949. — Inhibition in plant tissues by callus stimulating substances and related chemicals. *Amer. J. Bot.*, **36**, 368-378.
- MOREL (G.), 1950. — Sur la culture indéfinie de deux monocotylédones. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **230**, 1099-1101.
- MOREL (G.), 1956. — Métabolisme de l'arginine par les tissus de crown-gall de Topinambour. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **2**, 75.
- MOREL (G.) et DEMETRIADES (S.), 1955. — Action des régulateurs de croissance sur l'activité oxydasique de tissus de Topinambour. *Année Biol.*, **31**, 227-236.
- MOREL (G.) et DURANTON (H.), 1958. — Le métabolisme de l'arginine par les tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 2155-2168.
- MOYSE (A.), 1950 a. — Relations entre le métabolisme azoté et la respiration des feuilles détachées. *Thèse Fac. Sc.*, (Paris), 210 p.
- MOYSE (A.), 1950 b. — Les oxydations respiratoires et la respiration des plantes. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11^e série, **XI**, 29-52.
- NAGY (R.), RIKER (A. J.) et PETERSON (W. H.), 1938. — Some physiological studies of crown-gall and contiguous tissue. *J. Agric. Res.*, **57**, 545-546.
- NAYLOR (A. W.), 1950. — Observations on the effects of maleic hydrazide on flowering of Tobacco, Maize and Cocklebur. *Proc. Natl. Acad. Sc. (Washington)*, **36**, 230-232.
- NAYLOR (A. W.), 1951. — Accumulation of sucrose in Maize following treatment with maleic hydrazide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 340-342.
- NAYLOR (A. W.) et DAVIS (E. A.), 1950. — Maleic Hydrazide as a plant growth inhibitor. *Bot. Gaz.*, **112**, 112-115.
- NEISH (A. C.) et HIBBERT (H.), 1940. — Effect of crown-gall formation on the chemical composition of beets. *Canad. J. Res.*, **18**, 613-623.
- NEISH (A. C.) et HIBBERT (H.), 1943 a. — Carbohydrate metabolism of normal and tumor tissues of beet root. *Arch. Biochem.*, **3**, 141-157.

- NEISH (A. C.) et HIBBERT (H.), 1943 b. — Nitrogen metabolism of normal and tumor tissues of beet root. *Arch. Biochem.*, **3**, 159-166.
- NEWCOMB (E. H.), 1950. — Tobacco callus respiration and its response to 2 — 4 dinitrophenol. *Amer. J. Bot.*, **37**, 264-271.
- NEWCOMB (E. H.), 1951. — Effect of auxin on ascorbic acid oxidase activity in tobacco pith cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**, 504-509.
- NEWCOMB (E. H.), 1955. — The use of cultured tissue in a study of the metabolism controlling cell enlargement. *Année Biol.*, **31**, 195-214.
- NICKELL (L. G.), 1950. — Effect of certain plant hormones and colchicine on the growth and respiration of virus tumor tissue from *Rumex Acetosa*. *Amer. J. Bot.*, **37**, 829-835.
- NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.), 1957. — Auxin dependant growth of excised *Helianthus tuberosus*. II : Organic nitrogenous compounds. *Amer. J. Bot.*, **44**, 555-564.
- NORDMANN (R.), GAUCHERY (O.), DU RUISSEAU (J. P.), THOMAS (Y.) et NORDMANN (J.), 1954. — Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques. II : Le chromatogramme qualitatif de l'urine normale. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1641-1654.
- OCHOA (S.), 1952. — Enzymatic mechanisms of carbon dioxide fixation. *The Enzymes*, Vol. 2, Part 2 (Acad. Press. N. Y.), 935-936 et 960-961.
- PARIS (D.) et DUHAMET (L.), 1953. — Action d'un mélange d'acides aminés et de vitamines sur la prolifération des tissus de crown-gall de Scorsnère ; comparaison avec l'action du lait de Coco. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **236**, 1690-1692.
- PARIS (D.), DUHAMET (L.) et GORIS (A.), 1954. — Action des vitamines et des acides aminés contenus dans le lait de Coco sur la prolifération d'une souche de tissus de Carotte. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **148**, 296-299.
- PFEFFER (W.), 1895. — Ueber Elektion organischer Nährstoffe. *Jahrb. f. Wiss. Botan.*, **25**, 205-268.
- PHOUPHAS (C.), 1952. — Action de l'hydrazide maléique sur la teneur en substances glucidiques du tissu libérien de racine de Carotte cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **235**, 808-810.
- PHOUPHAS (C.), 1955. — Action de l'hydrazide maléique sur la croissance et la teneur en substances glucidiques d'une souche de Carotte cultivée *in vitro*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 331-334.
- PINCUS (G.) et THIMANN (K. V.), 1948. — *The Hormones*, vol. 1, (Acad. Press, N. Y.), chap. II et III.
- PLANTEFOL (L.), 1933. — Un eudiomètre simple. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, 992-1012.
- PLANTEFOL (L.), 1937 a. — Sur les oxydations respiratoires intrinsèques et extrinsèques. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **204**, 370-372.
- PLANTEFOL (L.), 1937 b. — Démonstration du caractère extrinsèque d'oxydations provoquées par le glucose. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **204**, 1886-1888.
- PLANTEFOL (L.), 1938. — Echanges respiratoires des tissus végétaux en culture. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **207**, 121-123.
- PLANTEFOL (L.) et GAUTHERET (R. J.), 1939. — Le glucose et la respiration des tissus végétaux. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **208**, 927-929.

- PLANTEFOL (L.), et GAUTHERET (R. J.), 1941. — Intensité des échanges respiratoires des tissus végétaux, tissus primitifs et tissus néoformés. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **213**, 627-629.
- PLANTEFOL (L.) et MOYSE (A.), 1948. — Un appareil universel d'extraction des gaz et un manomètre comparateur, utilisés dans l'analyse des échanges gazeux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, 121-128.
- PRADERA (E. S.), FERNANDEZ (E.) et CALDERIN (O.), 1942. — Coconut water, a clinical and experimental study. *Amer. J. Dis. of Child.*, **64**, 977-991.
- PRATT (R.), 1938. — Influence of indole-3-acetic acid on the respiration and growth of intact wheat seedling. *Amer. J. Bot.*, **25**, 389-392.
- RAVEUX (R.), BOVÉ (J.) et BOVÉ (C.), 1957. — Influence de la composition minérale du milieu de culture et d'une carence potassique sur les acides carboxyliques non volatils de C_2 à C_6 , les acides aminés hydrosolubles dans les cultures de tissus de *Citrus limonum*. Comparaison entre les cultures de tissus et les plantules du *Citrus limonum* quant à ces composés. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **244**, 482-485.
- REINDERS (D. E.), 1938. — The process of water uptake by disks of potato tissue. *K. Akad. Wet. (Amsterdam), Proc. sec. Sc.*, **41**, 820-831.
- RICHEZ (M.) et GAUTHERET (R. J.), 1954. — Action de l'hydrazide maléique sur la teneur en saccharose de fragments de tissus de betterave à sucre cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, **238**, 2442-2444.
- RIKER (A. J.) et GUTSCHE (A.), 1948. — The growth of sunflower tissue *in vitro* on synthetic media with various organic and inorganic sources of nitrogen. *Amer. J. Bot.*, **35**, 227-238.
- RUBNER (M.), 1906. — Energieumsatz im Leben einiger Spaltpilze. *Arch. Hyg. Bakter.*, **57**, 193-243.
- RYDON (H. M.) et SMITH (P. W. G.), 1952. — A new method for the detection of peptides and similar compounds on paper chromatograms. *Nature*, **169**, 922-923.
- SALTMAN (P.), KUNITAKE (G.), SPOLTER (H.) et SPITTS (C.), 1956. — The dark fixation of CO_2 by succulent leaves, the first products. *Plant Physiol.*, **31**, 464-468.
- SANGER (F.) et TUPPY (H.), 1951. — The amino acid sequence in the phenyl-alanyl chain of insulin. *Bioch. J.*, **49**, 463-490.
- SCHOENE (D. L.) et HOFFMAN (O. L.), 1949. — Maleic hydrazide, a unique growth regulant. *Science*, **109**, 588-590.
- SCOTT (R. W.), BURRIS (R. H.) et RIKER (A. J.), 1955. — Non volatile organic acids of crown-gall tissue culture and normal stem tissue. *Plant Physiol.*, **30**, 355-359.
- SHANTZ (E. M.) et STEWARD (F. C.), 1955. — The identification of Compound A from Coconut milk as 1-3 diphenylurea. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 6351.
- SIEGEL (B. U.) et CLIFTON (C. E.), 1950 a. — Energy relationships in carbohydrate assimilation by *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **60**, 573-583.

- SIEGEL (B. U.) et CLIFTON (C. E.), 1950 b. — Energetics and assimilation in the combustion of carbon compounds by *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **60**, 585-593.
- SILBERGER (J. Jr) et SKOOG (F.), 1953. — Changes induced by indoleacetic acid in nucleic acid contents and growth of tobacco pith tissue. *Science*, **118**, 443-444.
- SIVARAMAKRISHNAN (V. M.) et SARMA (P. S.), 1956. — The metabolism of glutamic acid in germinating green gram seeds. *Biochem. J.*, **62**, 132-135.
- SKOOG (F.), 1951. — *Plant growth substances* (University of Wisconsin Press, Madison), 232 p.
- SKOOG (F.), 1955. — Growth factors. Polarity and morphogenesis. *Année Biol.*, **31**, 1-13.
- SKOOG (F.) et ROBINSON (B. J.), 1950. — A direct relationship between indoleacetic effects on growth and reducing sugar in tobacco tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 565-568.
- SMITH (E. F.), 1911. — Crown-galls of plants. *Phytopathology*, **1**, 7-11.
- SMITH (F. G.), 1948. — Effect of 2-4 dichlorophenoxyacetic acid on the respiratory metabolism of bean stem tissue. *Plant Physiol.*, **23**, 70-80.
- SÖDING (H.), 1931. — Wachstum und Wanddehnbarkeit bei der Haferkoleoptile. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **74**, 127-151.
- SOMOGYI (M.), 1937. — A reagent for the copper-iodometric determination of very small amount of sugars. *J. Biol. Chem.*, **117**, 771-776.
- STETTEN (M. R.), 1955. — Metabolic relationship between glutamic acid, proline, hydroxyproline and ornithine. *Amino Acid Metabolism* (Johns Hopkins Press, Baltimore), 277-290.
- STEWARD (F. C.), BIDWELL (R. G. S.) et YEMM (E. W.), 1956. — Protein metabolism, respiration and growth. A synthesis of results from the use of carbon 14 labelled substrates and tissue cultures. *Nature*, **178**, 734-738 et 789-792.
- STEWARD (F. C.), BIDWELL (R. G. S.) et YEMM (E. W.), 1958. — Nitrogen metabolism, respiration and growth of cultured plant tissue. *J. exper. Bot.*, **9**, 11-51.
- STEWARD (F. C.), CAPLIN (S. M.) et MILLAR (F. K.), 1952. — New techniques for the investigation of metabolism nutrition and growth in undifferentiated cells. *Ann. Bot.*, **XVI**, 57-77.
- STEWARD (F. C.) et POLLARD (J. K.), 1956. — The amino acid composition of the total protein of growing and non growing plant tissues. *Plant Physiol.*, **31**, IX.
- STEWARD (F. C.) et SHANTZ (E. M.), 1954. — The growth of Carrot tissue explants and its relation to the growth factors present in Coconut milk. II : The growth promoting properties of Coconut milk for plant tissue cultures. *Année Biol.* **30**, 399-410.
- STEWARD (F. C.) et SHANTZ (E. M.), 1955. — The chemical induction of growth in plant tissue cultures. *Chemistry and mode of action of plant growth substances* (Butterworth Sc. Publ., London), 165-186.
- STEWARD (F. C.), THOMPSON (J. F.) et DENT (C. E.), 1949. — γ -aminobutyric acid : a constituent of the potato tuber. *Science*, **110**, 439-440.

- STEWART (F.C.), THOMSON (J.F.) et POLLARD (J.K.), 1958. — Contrasts in the nitrogenous composition of rapidly growing and non-growing plant tissues. *J. exper. Bot.*, **9**, 1-10.
- STEWART (F. C.), ZACHARIUS (R. M.) et POLLARD (J. K.), 1955. Nitrogenous compounds in plants. Recent knowledge derived from paper partition chromatography. *Biochemistry of Nitrogen* (Suomalainen Tiedekatemia, Helsinki), 321-366.
- STRAUSS (J.) et LA RUE (C. D.), 1954. — Maize endosperm tissue grown *in vitro*. I : Culture requirements. *Amer. J. Bot.*, **41**, 687-694.
- SYNGE (R. L. M.), 1951. — Methods for isolating ω -aminoacids : γ -aminobutyric acid from the Rye-grass. *Biochem. J.*, **48**, 429-434.
- TABONE (J.), ROBERT (O.), THOMASSEY (S.) et MAMOUNAS (N.), 1950. — Microcaractérisation de la cynurénine en présence de tryptophane. Application à l'étude des hydrolysats alcalins de tryptophane. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 529-534.
- TAMIYA (H.), 1932. — Zur Energetik des Wachstums. *Act. Phytochim.*, **6**, 227-304.
- TAMIYA (H.), 1935. — Le bilan matériel et l'énergétique des synthèses biologiques. *Actualités Sc. Intern.* (Hermann édit., Paris), 43 p.
- TAMIYA (H.) et YAMAGUTCHI (S.), 1933. — Über die Aufbau die Erhaltungsatmung beiträge zur Atmungsphysiologie der Schimmelpilze. *Act. Phytochim.*, **7**, 43-64.
- TATUM (L. A.) et CURME (J. H.), 1951. — Some responses of young Corn plants to maleic hydrazide. *Plant Physiol.*, **26**, 836-839.
- TERROINE (E. F.) et WURMSER (R.), 1922. — Energie de croissance. I : Le développement de l'*Aspergillus niger*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **4**, 519-567.
- TOENNIES (G.) et KOLB (J. J.), 1951. — Techniques and reagents for paper chromatography. *Anal. Chem.*, **23**, 823-826.
- TOLBERT (A. W.) et NAYLOR (N. E.), 1956. — Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves. *Physiol. Plant.*, **9**, 220-229.
- TULECKE (W. R.), 1953. — A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science*, **117**, 599-600.
- VAN OVERBEEK (J.), CONKLIN (B. E.) et BLASKESLEE (A. F.), 1942. — Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. *Amer. J. Bot.*, **29**, 472-477.
- VAN SLYKE (D. D.), 1929. — Manometric determination of primary amino nitrogen and its application to blood analysis. *J. Biol. Chem.*, **83**, 425-447.
- VAN SLYKE (D. D.), MAC FAYDEN (D. A.) et HAMILTON (P.), 1941. — Determination of free aminoacids by titration of the carbon dioxide formed in the reaction with ninhydrin. *J. Biol. Chem.*, **141**, 671-680.
- VICKERY (H. B.) et PUCHER (G. W.), 1939. — Chemical investigations of the rhubarb plant. III : Interpretations of the behaviour of the components during culture of detached leaves under various conditions. *Connecticut Agr. Exp. St.*, **424**, 107-157.

- VICKERY (H. B.), PUCHER (G. W.), SCHOENHEIMER (R.) et RITTENBERG (D.), 1940. — The assimilation of ammonia nitrogen by the Tobacco plant : a preliminary study with isotopic nitrogen. *J. Biol. Chem.*, **135**, 531-539.
- VIRTANEN (A. I.), 1955. — Neue Amino und Ketosäuren in grünen Pflanzen und die Biosynthese de Aminosäuren. *Angew. Chem.*, **14/15**, 381-388.
- VOGEL (H. J.), 1955. — On the glutamate, proline, ornithine, interrelation in various microorganisms. *Amino Acid Metabolism*. (Johns Hopkins Press, Baltimore), 335-346.
- WAELSCH (H.), 1952. — Certain aspects of intermediary metabolism of glutamine, asparagine and glutathione. *Adv. In Enzymol.*, **13**, 237-319.
- WAIN (R. L.) et WIGHTMAN (F.), 1956. — *The chemistry and mode of action of plant growth substances*, Symposium at Wye College. Univ. of London, July 1955. (Butterworths Sc. Publ. London), 312 p.
- WHITE (D. G.), 1950. — Blossoming of fruits delayed by maleic hydrazide. *Science*, **111**, 303.
- WHITE (P. R.), 1943. — *A handbook of Plant tissue culture* (The Jaques Cattel Press, Lancaster, Pennsylvania), 277 p.
- WHITE (P. R.), 1951. — Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **2**, 231-244.
- WHITE (P. R.) et BRAUN (A. C.), 1941. — Crown-gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science*, **94**, 239-241.
- WHITE (P. R.) et BRAUN (A. C.), 1942. — A cancerous neoplasm of plants autonomous bacteria free crown-gall tissue. *Cancer Research*, **2**, 597-617.
- WIGGANS (S. C.), 1954. — Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. *Amer. J. Bot.*, **41**, 321-326.
- WILDMAN (S. G.), FERRI (M. G.) et BONNER (J.), 1947. — The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. *Arch. Biochem.*, **13**, 131-144.
- WILSON (C. M.) et SKOOG (F.), 1954. — Indoleacetic induced changes in uronide fractions and growth of excised Tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, **7**, 204-211.
- WITTWER (S. H.) et HANSEN (C. M.), 1951. — The reduction of storage losses in sugar Beets by preharvest foliage sprays of maleic hydrazide. *Agron. J.*, **43**, 340-341.
- WITTWER (S. H.), SHARMA (R. C.), WELLER (L. E.) et SELL (H. M.), 1950. — The effect of preharvest foliage sprays of certain growth regulators on sprout inhibition and storage quality of carrots and onions. *Plant Physiol.*, **25**, 539-540.
- WYNN (V.), 1949. — A peptide like contaminant of filter paper. *Nature*, **164**, 445.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.

CHAPITRE PREMIER : Historique.

I. — <i>Le métabolisme des tissus végétaux cultivés in vitro</i>	7
1) Le métabolisme azoté.....	7
2) Le métabolisme glucidique.....	9
3) Les échanges gazeux respiratoires.....	10
4) L'activité de quelques oxydases.....	12
5) Le rendement de croissance des tissus cultivés <i>in vitro</i>	12
6) Le métabolisme des substances membranaires.....	13
II. — <i>L'action des diverses substances de croissance sur le métabolisme végétal</i>	13
1) L'action des auxines.....	13
2) L'action du lait de Coco.....	14
3) L'action de l'hydrazide maléique.....	15
III. — <i>Les propriétés physiologiques des tissus de crown-gall</i>	15

CHAPITRE II : Synthèses et dégradations au cours de la croissance de tissus végétaux cultivés *in vitro*.

I. — <i>Méthodes et techniques</i>	19
A. Culture des tissus.....	19
1) Milieux de culture.....	19
2) Tissus cultivés.....	20
3) Volume et poids des fragments cultivés.....	20
B. Mesure des échanges gazeux respiratoires.....	20
C. Analyse des groupes de substances azotées.....	22
1) Dessiccation et extraction.....	22
2) Dosages des différents groupes.....	22
D. Analyse des glucides solubles.....	23
1) Fixation et extraction.....	23
2) Dosages.....	23
3) Signification des dosages de glucides.....	23
E. Modes d'expression des résultats.....	24
1) Expression des échanges gazeux respiratoires.....	24
2) Expression des résultats des analyses des constituants cellulaires.....	24
II. — <i>Etude de la physiologie de fragments de xylème de tubercules de scorsonère cultivés in vitro</i>	25
1. Métabolisme de fragments de xylème de tubercules de scorsonère lors de la mise en culture.....	25
1) L'influence des opérations d'isolement.....	25
2) Les variations physiologiques pendant les premières 24 heures qui suivent l'ensemencement.....	25
2. Métabolisme des fragments de xylème de tubercules de scorsonère cultivés <i>in vitro</i> en présence de différentes substances de croissance.....	27
A. Expériences.....	27
B. Résultats.....	28
1) Variations du poids des fragments et de leur teneur en eau.....	30
2) Variations des groupes de substances azotées.....	32
3) Variations des glucides solubles.....	34

4) Utilisation des glucides du milieu.....	36
5) Variations de l'intensité des échanges gazeux respiratoires.....	36
6) Variations des quotients respiratoires.....	38
C. Interprétations et discussion.....	38
1) La croissance des tissus.....	38
2) Les variations de l'intensité respiratoire.....	41
3) L'utilisation des glucides.....	44
a) Evaluation des différentes formes d'utilisation des glucides.....	44
b) Bilan de l'utilisation du glucose.....	45
4) L'utilisation de l'énergie libérée par les oxydations respiratoires.....	48
a) Calculs de la respiration d'entretien et de la respiration de croissance.....	49
b) Discussion des résultats.....	52
5) Conclusions. Le métabolisme des fragments de xylème de tubercule de <i>Scorsonère</i> cultivés <i>in vitro</i>	54
a) Métabolisme des témoins.....	54
b) Influence de l'acide α -naphthalène-acétique... ..	55
c) Influence du lait de Coco.....	56
d) Influence de l'hydrazide maléique.....	56
III. — Etude de la physiologie des colonies de tissus de crown-gall de scorsonère ayant subi de nombreux repiquages.....	56
A. Expériences.....	56
B. Résultats.....	57
1) Variations du poids des colonies et de leur teneur en eau.....	57
a) Variations du poids de substance fraîche.....	57
b) Variations du poids de substance sèche.....	57
c) Variations de la teneur en eau.....	59
2) Variations des groupes de substances azotées.....	59
3) Variations des glucides solubles.....	61
4) Utilisation des glucides du milieu.....	63
5) Variations de l'intensité des échanges gazeux respiratoires.....	63
6) Variations des quotients respiratoires.....	65
C. Interprétations et discussions.....	65
1) La croissance des colonies. Accroissements relatifs des divers constituants.....	65
2) Les variations de l'intensité respiratoire.....	65
3) L'utilisation des glucides.....	68
4) L'utilisation de l'énergie libérée par les oxydations respiratoires.....	69
a) Calcul du coefficient respiratoire d'entretien....	70
b) Calcul de la respiration d'entretien et de la respiration de croissance.....	71
c) Discussion des résultats obtenus.....	71
5) Conclusion. Métabolisme des tissus de crown-gall de <i>Scorsonère</i> après leur repiquage sur un milieu neuf.....	74
a) Métabolisme des témoins.....	74
b) Influence de l'acide α -naphthalène-acétique.....	75
c) Influence du lait de Coco.....	75
IV. — Conclusion. La physiologie des fragments de tubercule et des colonies de crown-gall, au cours de la culture <i>in vitro</i>	76

CHAPITRE III : Les acides aminés des tissus sains, des tissus de crown-gall cultivés *in vitro* et leur métabolisme.

I. — Les différents acides aminés des tissus sains, des tissus de crown-gall et des tissus accoutumés.....	79
A. Méthodes et techniques.....	79
1) Fixation. Séparation des différentes fractions.....	79
a) Fixation, extraction des acides aminés et des polypeptides.....	79

b) Séparation des acides aminés libres et des polypeptides.....	79
c) Hydrolyse des polypeptides.....	80
d) Hydrolyse des protéines.....	80
2) Chromatographie sur papier.....	82
3) Identification des acides aminés.....	83
4) Dosage des amides et de l'azote aminé.....	84
B. Résultats.....	84
1) Les acides aminés des tissus sains et des tissus de crown-gall de Scorsonère.....	84
a) Les acides aminés des tissus normaux.....	85
b) Les acides aminés des tissus de crown-gall.....	87
2) Les acides aminés des tissus de crown-galls de diverses espèces.....	87
3) Les acides aminés des tissus accoutumés de Scorsonère.....	88
C. Discussion.....	88
II. — <i>L'isolement et les propriétés du composé particulier aux tissus de crown-gall. (Inconnu B).</i>	89
A. Isolement.....	89
1) Séparation par chromatographie sur poudre de cellulose.....	90
a) Premier essai.....	90
b) Essais ultérieurs.....	91
2) Séparation par chromatographie sur papier.....	91
B. Propriétés de l'Inconnu B.....	92
1) Recherche d'une formule brute.....	92
2) Propriétés.....	93
III. — <i>Le métabolisme de l'acide glutamique dans les tissus de crown-gall de Scorsonère.</i>	94
A. Méthodes et techniques.....	94
1) Expériences.....	94
2) Analyses.....	95
B. Résultats.....	97
C. Interprétations.....	98
1) Genèse des différentes substances radioactives obtenues.....	98
2) Importance relative des voies d'utilisation de l'acide glutamique.....	102
Résumé et conclusions générales.....	105
Bibliographie.....	111

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

“ Rôle des caroténoïdes dans la physiologie des végétaux ”.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 2 juin 1958

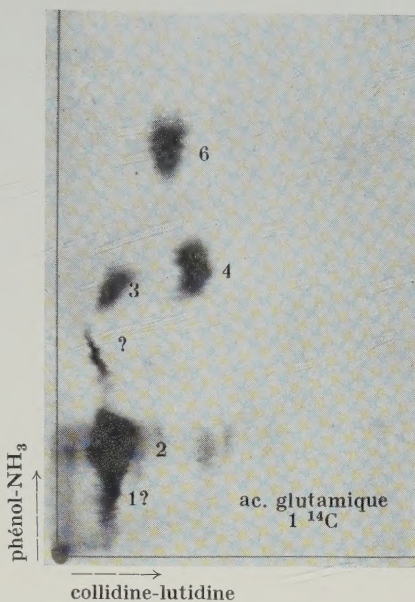
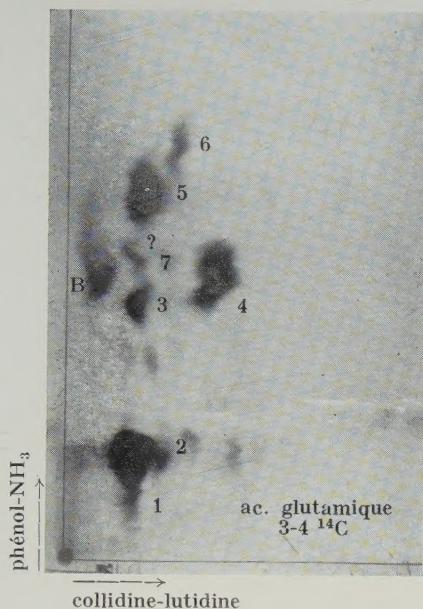
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

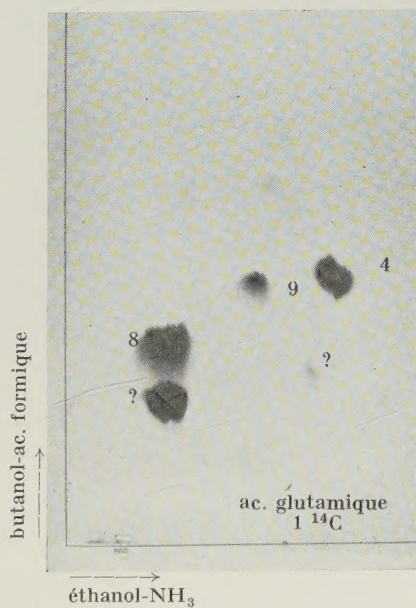
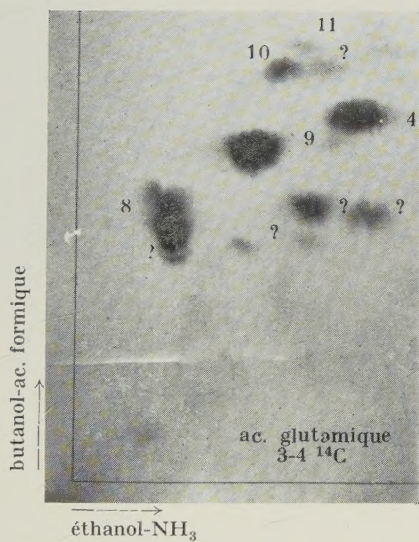
VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Université de Paris,

Jean SARRAILH.



Acides aminés



Acides organiques

Fig. 6. — Autoradiochromatogrammes des acides aminés libres et des acides organiques, extraits de tissus de crown-gall de *Scorsonère* alimentés en acide glutamique marqué par ¹⁴C, soit en 3-4, soit en 1.

Légende — 1 : ac. aspartique — 2 : ac. glutamique — 3 : glutamine — 4 : ac. pyrrolidone-carboxylique — 5 : ac. γ-aminobutyrique — 6 : proline — 7 : alanine. — 8 : ac. citrique et isocitrique — 9 : ac. malique — 10 : ac. succinique — 11 : ac. fumarique — B : inconnu B — ? : autres inconnus.

